

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



**IDENTIFICACIÓN DE LA QUINASA HaIA Y EL
ESTUDIO DE SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DE
LA HOMEOSTASIS DE CATIONES EN
“ASPERGILLUS NIDULANS”.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Laura Cobeño Fariñas

Bajo la dirección del doctor

Eduardo A. Espeso Fernández

Madrid, 2011

ISBN: 978-84694-2675-3

© Laura Cobeño Fariñas, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III



Identificación de la quinasa Hala y el estudio de su papel
en la regulación de la homeostasis de cationes en
Aspergillus nidulans.



Memoria presentada por Laura Cobeño Fariñas para optar al grado de Doctor.

Director de Tesis:

Eduardo A. Espeso Fernández

Científico Titular del CSIC

Centro de Investigaciones Biológicas

Tutora:

M^a José Valderrama Conde

Departamento de Microbiología III

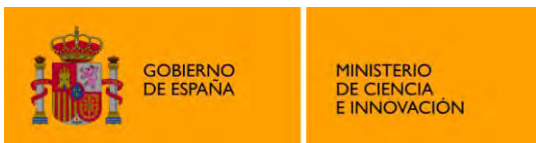
Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Complutense de Madrid

TESIS DOCTORAL

LAURA COBEÑO FARIÑAS

2010



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (C.I.B) del CSIC bajo la supervisión del Dr. Eduardo A. Espeso Fernández, Científico Titular del CSIC.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido financiado por fondos públicos de la Dirección General de Investigación a través de los proyectos BFU2009-08701 y BFU2006-04185.

A mis padres y a mi hermano

A Miguel

AGRADECIMIENTOS

“Camina confiado en la dirección de tus sueños. Vive la vida que habías imaginado” (Henry David Thoreau). Esta tesis es uno de mis sueños. El camino no fue fácil, pero he tenido la suerte de encontrar en él muchas personas que me han apoyado. Hoy que cumplo este sueño, es el momento de agradecerse a todos aquellos que me han ayudado a conseguirlo.

En primer lugar quiero dar las gracias al “culpable” de esta tesis, la persona que ha hecho posible todo esto, Eduardo. Gracias por confiar en mí desde el primer momento, por darme todo tu apoyo. Estuviste presente en mis primeros pasos en el laboratorio y a ti te debo el haber llegado hasta aquí. Gracias por tu paciencia infinita, por tus clases magistrales de casi cualquier cosa, por tus consejos, por tu dedicación, pero sobre todo gracias por devolverme la ilusión por la ciencia.

También quiero dar las gracias a todos mis compañeros de laboratorio por recibirme tan maravillosamente en mi vuelta al CIB y por haberme hecho sentir en casa otra vez desde el primer momento. Gracias a Antonio, Juanfran, Areti, Patri, Oier y por supuesto a todas las personas pasaron por el laboratorio en mi primera etapa: Silvia, Lidia, Javi, Juanqui, América y Olga. Pero quiero aprovechar para dar las gracias de manera especial a las dos personas que más me han ayudado en esta aventura y sin las cuales esta tesis no hubiera sido lo mismo: Ane y Erika, gracias chicas por estar siempre ahí para ayudarme con cualquier técnica y por echarme una mano siempre que lo he necesitado. Gracias a Elena, porque aunque no nos hemos visto todo lo que me hubiera gustado, eres un pilar del laboratorio tanto a nivel técnico como personal. Quiero agradecer también al grupo del Profesor Herb Arst del Imperial College de Londres su inestimable colaboración en este trabajo y la cesión de varias de las cepas que he utilizado.

Dicen que quién tiene un amigo tiene un tesoro, y yo tengo la suerte de tener mi “cofre” lleno de buenos amigos a los que también debo parte de esta tesis. En primer lugar a mis biólogas, gracias por todos los momentos que hemos vivido y por seguir ahí tantos años después, a Miguel y Estefi por su apoyo y a Pilar por esas tardes de cine y Mac para desconectar un poco. Gracias también a Bárbara y Antonio por abrirme las puertas de su casa como si fuera uno más de la familia. De entre todos los amigos hay cuatro personas que son muy especiales en mi vida y que han estado ahí siempre, amigos con mayúsculas. Ellos que me han apoyado en los momentos difíciles, prestando siempre su hombro para lo que hiciera falta, y por supuesto celebrando los éxitos y las cosas maravillosas que han sucedido en mi vida. Vosotros cuatro, Nacho y Paula; María y Carlos, gracias de todo corazón por formar parte de mi vida, os quiero y espero teneros a mi lado siempre.

Gracias a mis abuelos, por estar pendientes de nosotros, por desvivirse, por malcriarnos y por estar siempre ahí para echar una mano, os quiero yayos.

Y ahora llegan los párrafos que estaba deseando escribir desde que comencé esta tesis. Ahora es el momento de dar las gracias a las cuatro personas más importantes de mi vida. A ellos que son mi motor. A mi hermano, Rober, por ser el perfecto compañero de juegos y porque me has enseñado muchas cosas, aunque no lo creas. Gracias por darme siempre un empujón para seguir adelante. A mis padres, que son mi modelo a seguir. No hay páginas suficientes para agradecerlos todo lo que hacéis por mí. Todo lo bueno que consiga en esta vida os lo debo a vosotros. Gracias por los valores que nos habéis enseñado y por ser como sois, os quiero.

No puede estar más agradecida a la vida que no solo me ha dado unos padres y un hermano maravillosos, sino que además ha puesto en mi camino a la mejor persona del mundo, mi alma gemela, Miguel. Gracias por ayudarme y comprenderme en todas y cada una de mis decisiones y animarme a luchar por mis sueños. Gracias por apoyarme desde el principio con esta aventura, todas las horas invertidas en esta tesis te las he robado a ti y espero poder devolvértelas con creces. Eres mi mitad y no comprendo la vida sin ti. Gracias por estar a mi lado. Te quiero.

ABREVIATURAS

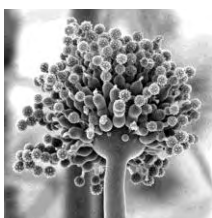
aa:	Aminoácido
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
CDS:	Secuencia codificante
cDNA:	DNA codificante
cM:	CentiMorgan
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DNAg:	Ácido desoxirribonucleico genómico
DNAsa:	Desoxirribonucleasa
DO:	Densidad óptica
DTT:	1,4-ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilén diamino tetracético
Fig.:	Figura
FT:	Factor de transcripción
GABA:	Ácido γ -aminobutírico
GFP:	Proteína fluorescente verde
HA:	residuos 98-106 de la hemaglutinina del virus de la gripe humana
HEPES:	Ácido N-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
Hxk:	Hexoquinasa
IgG:	Inmunoglobulina G
kb:	kilo base
kDa:	kilo Dalton
MCA:	Medio completo de <i>Aspergillus</i>
MFA:	Medio de fermentación para <i>Aspergillus</i>
MMA:	Medio mínimo de <i>Aspergillus</i>
MMR:	Medio mínimo de regeneración de <i>Aspergillus</i>
MOPs:	Ácido 3-(N-morfo) propanosulfónico
mRFP:	Proteína fluorescente roja monomérica
mRNA:	RNA mensajero
myc:	residuos 408-439 de la proteína p62c-myc humana
NES:	Señal de exportación nuclear
NLS:	Señal de localización nuclear
pb:	Par de bases
PBS:	Tampón fosfato-salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG:	Polietilenglicol.
RNA:	Ácido ribonucleico
r.p.m.:	Revoluciones por minuto
rRNA:	RNA ribosómico
SDS:	Sodio dodecil sulfato
SSC:	Citrato salino
TCA	Ácido tricloroacético
Tris:	Tris(hidroximetil)-aminometano
UV:	Ultravioleta
UTR:	Región no traducida (“ <i>untranslated region</i> ”)

WMM: “Watch minimal medium”

Las abreviaturas que no se indican siguen el código de la IUPAC

Las tablas y figuras contenidas en este trabajo se citan seguidas de una letra, (I: Introducción; M: Materiales y Métodos; R. Resultados; D; Discusión) que hace referencia a la sección en que aparecen, y de un número que indica el orden que ocupan dentro de dicha sección.

ÍNDICE



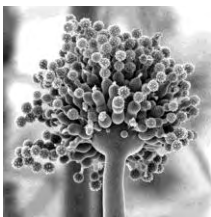
ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Aspergillus nidulans</i>	1
1.2 Homeostasis de cationes	5
1.2.1 Generalidades	5
1.2.2 Homeostasis de cationes en levaduras	6
1.2.3 Homeostasis de cationes en <i>Aspergillus</i>	9
1.3 Transportadores de potasio	13
1.3.1 Generalidades	13
1.3.2 Transportadores de potasio en levaduras	18
1.4 Regulación del transporte de potasio	22
1.4.1 Regulación del transporte en levaduras	22
1.4.2 Regulación mediada por las quinasas Hal4/Hal5 en levaduras	24
1.4.3 Regulación en <i>A. nidulans</i>	25
1.5 Antecedentes a esta tesis	27
2.- OBJETIVOS	33
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1 Condiciones y medios de cultivo	37
3.1.1 Medios y suplementos para <i>Aspergillus nidulans</i>	37
3.1.2 Ensayos de resistencia/sensibilidad a cationes	42
3.1.3 Otras soluciones utilizadas	43
3.2 Cepas de <i>Aspergillus</i>, plásmidos y oligonucleótidos utilizados	46
3.2.1 Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i>	46
3.2.2 Plásmidos utilizados en <i>Aspergillus</i>	47

3.2.3 Oligonucleótidos.....	48
3.2.4 Generación de casetes mediante PCRs de fusión.....	49
3.3 Técnicas en <i>Aspergillus nidulans</i>.....	53
3.3.1 Mantenimiento y cultivo de estirpes.....	53
3.3.2 Transformación de <i>A. nidulans</i>	53
3.3.3 Análisis fenotípicos mediante crecimiento en medio sólido.....	55
3.3.4 Cruces entre estirpes de <i>Aspergillus</i>	55
3.4 Técnicas de biología molecular, bioquímica y proteómica.....	56
3.4.1 Extracción de proteínas totales de <i>A. nidulans</i>	56
3.4.2 Ensayos de inmunodetección de proteínas, “Western blot”.....	57
3.4.3 Fraccionamiento celular.....	58
3.4.4 Extracción de DNA en <i>Aspergillus</i>	61
3.4.5 Análisis de DNA por el método de Southern blot.....	62
3.4.6 Análisis del RNA por el método de Northern blot.....	63
3.5 Microscopía de fluorescencia y análisis de las imágenes.....	65
3.6 “Kits” de biología molecular y bioquímica y otros componentes comerciales utilizados en esta tesis.....	66
3.6.1 “Kits” de biología molecular y bioquímica.....	66
3.6.2 Productos radiactivos.....	67
3.6.3 Reactivos y enzimas de biología molecular.....	67
3.7 Herramientas bioinformáticas.....	68
<u>4.- RESULTADOS</u>	<u>71</u>
4.1 Selección de supresores del fenotipo de sensibilidad al molibdato causado por la mutación <i>pacC</i>^{+/-70001}.....	71
4.2 Mutante MoR24.....	75
4.3 Análisis genético del mutante MoR24.....	76
4.4 Identificación de MoR24, AN8830.....	77

4.5 Análisis funcional de HalA.....	90
4.5.1 Estrategia para la generación de la cepa nula de <i>halA</i>	90
4.5.2 Papel de HalA en la respuesta a estrés catiónico.....	93
4.5.3 Papel de HalA en la utilización de fuentes de nitrógeno.....	94
4.5.4 Modelado de la proteína mutante y silvestre HalA.....	96
4.6 Papel de la proteína quinasa HalA en la homeostasis de potasio y sodio.....	100
4.6.1 Efecto de la ausencia de sodio y potasio en el crecimiento.....	100
4.6.2 Efecto de la ausencia de potasio en el crecimiento de las cepas.....	102
4.6.3 Estudio del transporte de sodio y potasio en <i>A. nidulans</i>	103
4.7 Regulación por potasio de HalA.....	105
4.8 Localización subcelular de HalA.....	108
4.9 Identificación y estudio de los transportadores de potasio.....	114
4.9.1 Identificación de transportadores de potasio en <i>A. nidulans</i>	114
4.9.2 Análisis de la expresión de los Trk.....	116
4.9.3 Construcción de cepas nulas para los distintos transportadores.....	118
4.9.4 Mantenimiento del potencial de membrana, papel de HalA y TrkB.....	120
4.9.5 Papel de los transportadores Trk en la respuesta a estrés catiónico.....	122
4.9.6 Localización subcelular de TrkB.....	124
5.- DISCUSIÓN	133
5.1 HalA es un factor importante en la respuesta a estrés catiónico.....	133
5.2 HalA y el sistema de regulación de pH ambiental.....	137
5.3 Genética clásica versus genética en reverso para el estudio de la homeostasis de cationes.....	140
5.4 Sistema quinasa-fosfatasa en la respuesta a estrés salino.....	143
5.5 Sistema de transporte de potasio en <i>A. nidulans</i>	147
6. - CONCLUSIONES	157
7. - BIBLIOGRAFÍA	161

INTRODUCCIÓN



1.- INTRODUCCIÓN

1.1 *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso perteneciente a la familia Trichocomaceae, phylum Ascomycota [1]. Este hongo presenta un tipo de crecimiento hiperpolarizado formando largos filamentos denominados hifas y muestra ramificación lateral en los compartimentos celulares más posteriores de la hifa. Las células vegetativas de *A. nidulans* son sincitios multinucleados. Los núcleos de cada sincitio contienen la misma información genética, salvo en el caso de los heterocariontes (ver más adelante). Las hifas están divididas por septos perforados a través de los cuales se produce el intercambio de nutrientes y efectores entre los diferentes compartimentos o células. *A. nidulans* es un hongo homotálico cuyas hifas pueden entrar en contacto y fusionarse (anastomosis) intercambiando así material citoplásmico y nuclear [2].

En el ciclo de vida de este hongo (esquemático en la figura I1) se pueden diferenciar tres fases de desarrollo: vegetativa, sexual y parasexual [3]. La fase de vida vegetativa comienza con la germinación de una espóra asexual (conidiospora) o sexual (ascospora) que da lugar a la formación de hifas tubulares que crecen de manera hiperpolarizada por extensión apical y ramificación lateral, formando un entramado de hifas interconectadas denominado micelio. Sobre un medio sólido el micelio del hongo se expande simétricamente formando colonias de forma más o menos radial, y necesitan de al menos 18 horas de crecimiento para alcanzar la plena competencia para comenzar a producir las estructuras de esporulación asexual que se denominan conidióforos. El proceso de esporulación asexual ha sido estudiado en detalle en este hongo [4] y es interesante resaltar que cada conidiospora es uninucleada y que todas comparten la

INTRODUCCIÓN

misma dotación genética que el micelio homocariótico. La finalización de la formación de las estructuras reproductoras asexuales suele venir seguida de la iniciación del ciclo de reproducción sexual del hongo [1].

Los cuerpos fructíferos se denominan cleistotecios o peritecios y en su interior se encuentran una gran cantidad de sacos denominados ascas, que contienen las esporas sexuales o ascosporas. Las ascosporas son siempre haploides y contienen dos núcleos idénticos que proceden de una mitosis sin división celular. La tercera fase de vida de *A. nidulans* es la denominada parasexual. Durante la fase vegetativa, *A. nidulans* es generalmente haploide pero sus hifas tienen la capacidad de fusionarse (anastomosis) e intercambiar material celular por anastomosis y dar lugar, en el caso de que las hifas fusionadas pertenezcan a cepas genéticamente diferentes, a individuos heterocariontes que poseen núcleos haploides de distinta dotación genética [1].

Adicionalmente, tras la anastomosis, se puede producir la fusión de los núcleos haploides para dar lugar a núcleos diploides. Esta capacidad de formar cepas diploides así como la posibilidad de inducir su haploidización mediante la utilización de drogas como el benomilo que interfieren en la segregación cromosómica en la mitosis [5], supone una potente herramienta genética que permite la localización cromosómica de genes [2].

Aspergillus nidulans es un microorganismo saprofita que posee una gran capacidad para adaptarse y vivir en ambientes muy diversos tanto en el aspecto físico-químico como en el biológico. Esta extrema variabilidad de nichos se corresponde con la elevada versatilidad metabólica de este hongo filamentoso que le permite, por ejemplo, crecer en un amplísimo rango de pH ambiental, desde pH 2.5 hasta 10.5 [6]. Para poder sobrevivir en estos rangos de valores de pH, los genes cuyos productos de traducción hayan de desarrollar sus funciones en el medio extracelular o en la interfase [2]

con el medio intracelular, como es el caso de enzimas extracelulares, enzimas implicadas en la producción de metabolitos secundarios y toxinas, o permeasas, han de estar sometidos a una regulación transcripcional en respuesta a la variación del pH ambiental, puesto que normalmente estos metabolitos y enzimas poseen un rango de pH óptimo de actuación.

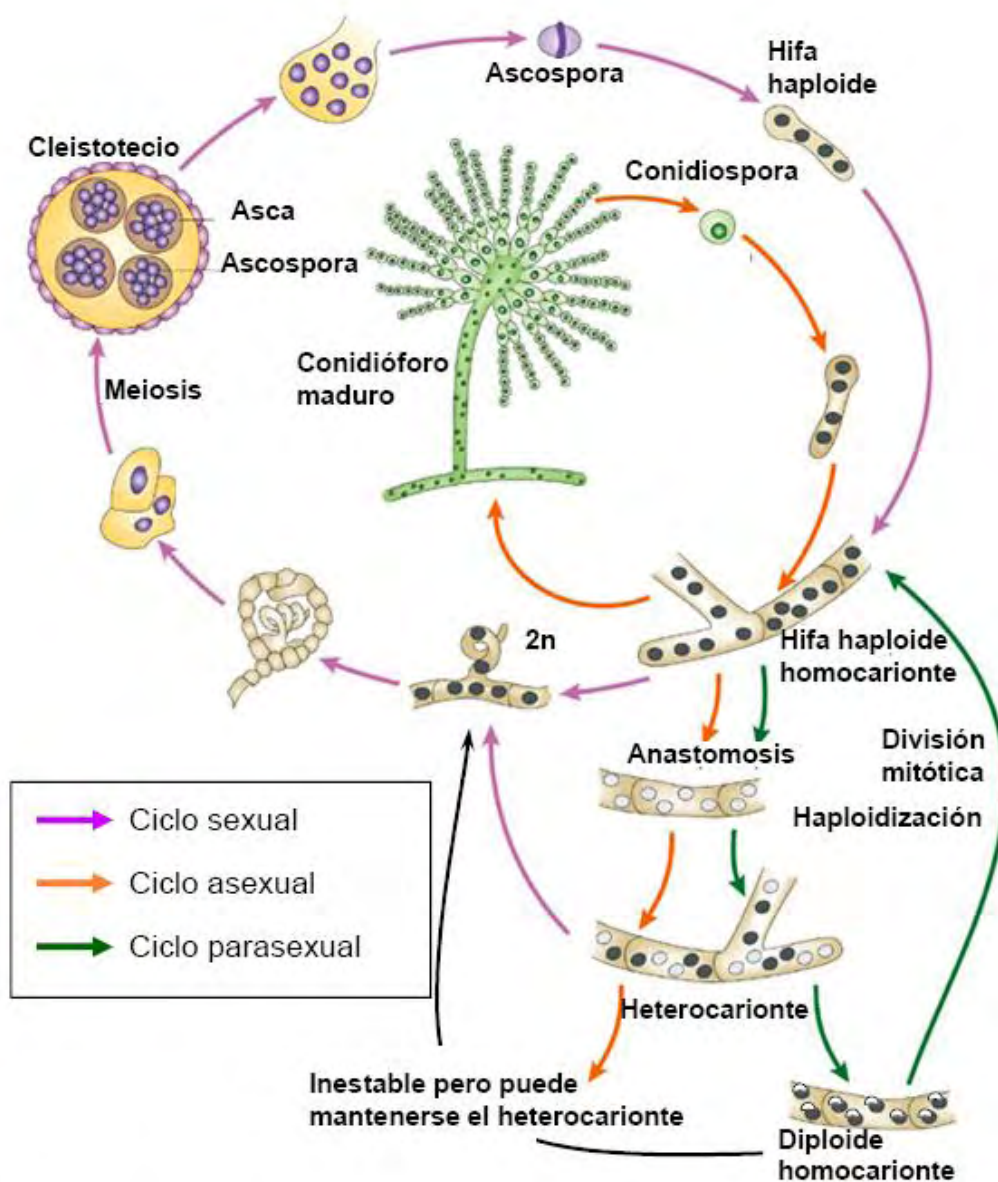


Figura I1: Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. Imagen tomada de [3].

La secuencia del genoma de *A. nidulans* se publicó en diciembre de 2005. Contiene 30 Mpbs organizadas en ocho cromosomas y se ha estimado un número de 10.000 genes [7]. La disponibilidad de dicha información es una nueva e importante herramienta de trabajo y supone un avance significativo que permitirá seguir utilizando *A. nidulans* como organismo modelo, genéticamente manipulable, en estudios de genética y biología celular y molecular en eucariotas.

Como organismo homotático, con un ciclo sexual bien caracterizado, constituye el modelo genético de referencia para otras especies asexuales y heterotáticas del género *Aspergillus* de gran interés en industria, como *A. oryzae* o *A. flavus*, o en medicina, como *A. fumigatus*. A esta característica se une su enorme versatilidad metabólica, que ha permitido identificar numerosas rutas del metabolismo primario y secundario, además de la identificación de los genes implicados en enfermedades metabólicas de origen genético en humanos [8]. Las técnicas de biología molecular aplicables a este hongo son diversas y permiten realizar cualquier abordaje experimental: etiquetado, reemplazamientos génicos [9], análisis de la localización subcelular de proteínas [10,11], análisis proteómicos [12,13], etc.

El crecimiento hiperpolarizado, el diseño celular sincitial con múltiples núcleos y la existencia de citoesqueletos de microtúbulos y actina, son características diferenciales y le hacen ser un modelo de estudios de estos procesos celulares y de sus interrelaciones, y en algunos casos aproximan a este hongo a modelos y tipos celulares de metazoos.

1.2 HOMEOSTASIS DE CATIONES

1.2.1 Generalidades

La homeostasis de las concentraciones intracelulares de iones es una propiedad fundamental de las células. Consecuentemente, los transportadores de iones y sus sistemas de regulación, tanto positivos como negativos, tienen funciones fisiológicas de gran importancia. Estos sistemas se ocupan principalmente de mantener las concentraciones de iones dentro de un rango óptimo para los sistemas celulares. En general este rango consiste en concentraciones relativamente altas de potasio (10^{-1} M) y magnesio (10^{-3} M), concentraciones bajas de sodio (10^{-2} M) y concentraciones muy bajas de protones (10^{-7} M) y calcio (10^{-7} M) todas en relación a la concentración extracelular [14]. Además, las concentraciones de potasio son el principal determinante de algunos parámetros fisiológicos tan importantes como el volumen celular, la turgencia o la fuerza iónica del citoplasma en hongos y plantas, que determinan conjuntamente la óptima hidratación de macromoléculas y membranas [15].

El mantenimiento de las concentraciones internas de iones frente a un amplio rango de condiciones extracelulares está mediado por complejas rutas homeostáticas. Las señales que disparan las respuestas de adaptación pueden ser cambios en la turgencia detectados en la membrana plasmática, o cambios en las concentraciones intracelulares de cationes como el potasio, el sodio o el calcio, que son detectados por proteínas citosólicas [15]. Un mejor entendimiento de estos sistemas y de su regulación puede tener un considerable valor práctico, así, por ejemplo, en medicina, la caracterización de transportadores de iones y su regulación, ha contribuido a la demostración de que los defectos en la homeostasis iónica contribuyen al riesgo de padecer alta presión arterial [16].

Por otra parte, en agricultura, el estudio de la homeostasis de iones podría facilitar el desarrollo de plantas con mayor tolerancia a sequía o salinidad por medio de técnicas de ingeniería genética [15].

1.2.2 Homeostasis de cationes en levaduras

S. cerevisiae está considerada como la levadura modelo por excelencia y existe gran cantidad de información sobre numerosos procesos celulares en este organismo. Así, se han identificado diferentes transportadores de potasio y/o sodio en esta levadura (figura I2). En *S. cerevisiae* los dos sistemas específicos de transporte de potasio están mediados por Trk1 y Trk2. Ambos transportadores están finamente regulados y pueden funcionar tanto a baja como a alta afinidad [17,18,19]. Alternativamente a la ausencia de Trk existe un proceso de transporte de potasio no específico, sin caracterizar plenamente, en el que podrían estar implicados transportadores de otros sustratos como aminoácidos o azúcares [20], o un canal no específico de cationes (denominado NSC1) cuyo gen no ha sido aún identificado [21].

En *Schwanniomyces occidentalis* se ha identificado un sistema de transporte de potasio de alta afinidad constituido por el gen HAK1 [22], presente también en otras especies como *Debaryomyces hansenii* o *Neurospora crassa* que no existe en *S. cerevisiae*.

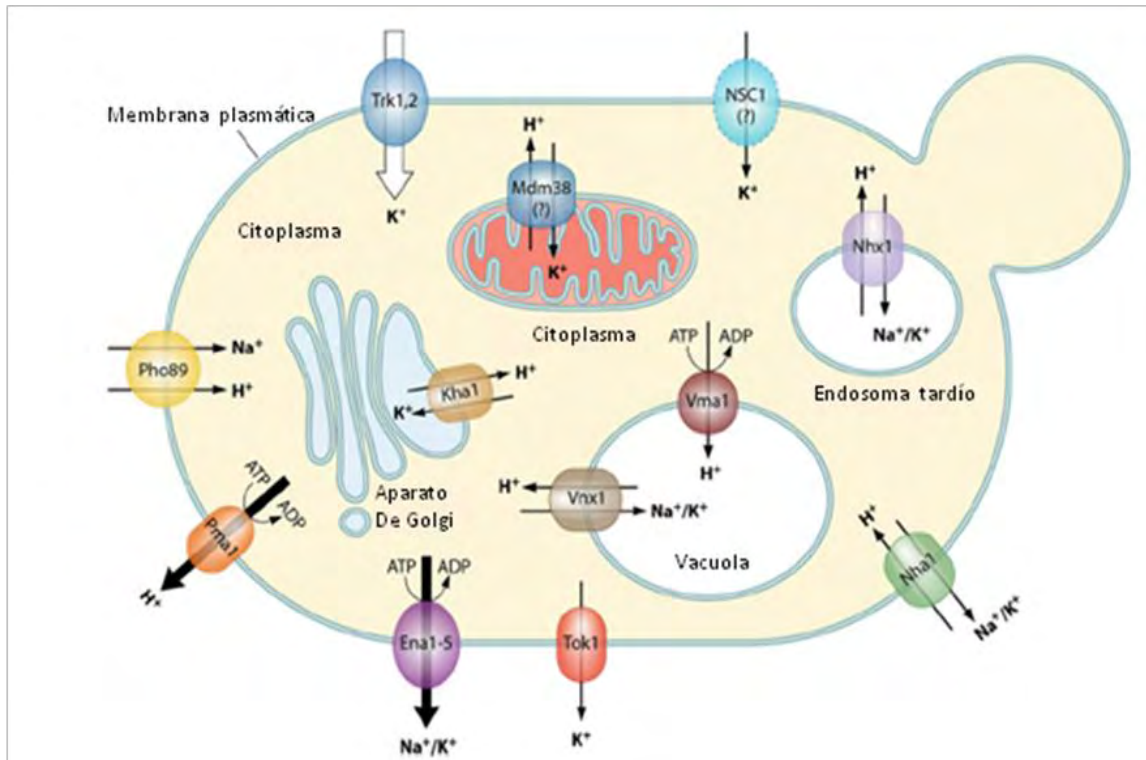


Figura I2: Principales transportadores de cationes en las membranas de *S. cerevisiae*. Adaptado de [32].

En *S. cerevisiae* se han caracterizado diversos genes cuyos productos están relacionados con la salida de potasio de la célula: YCK1/TOK1 [23], NHA1 [24] y ENA1-4 [28]. El gen TOK1 podría codificar para el primer miembro de una familia de canales selectivos de potasio dependientes de voltaje [25]. La proteína codificada por NHA1 se identificó como un antiportador Na⁺/H⁺ de la membrana plasmática, aunque se ha demostrado que también es capaz de llevar a cabo un proceso de intercambio K⁺/H⁺ [24]. Los genes ENA también pueden estar implicados en la salida de K⁺ de la célula.

En *S. cerevisiae* no parecen existir transportadores específicos para la entrada de sodio en las células, sino que éste entra por otros transportadores como los de potasio o inespecíficos [26]. Un ejemplo de la entrada de sodio a través de un canal inespecífico

INTRODUCCIÓN

es el transportador Pho89, que es un cotransportador de sodio y fosfato que funciona principalmente en la fase activa del crecimiento y está regulado por las concentraciones de fosfato inorgánico. También se han encontrado evidencias de la existencia de este transportador en *N. crassa* [26]. La entrada de sodio y potasio a través de Trk1 y Trk2 es competitiva, aunque estos transportadores presentan una mayor afinidad por el potasio permitiendo la entrada selectiva del mismo cuando ambos cationes están presentes [27].

La tolerancia a sal en *S. cerevisiae*, asociada a la capacidad de mantener bajos niveles de sodio en el citoplasma, dificultando su entrada y expulsando eficazmente el sodio que entra, es posible gracias al sistema de expulsión formado por Na⁺-ATPasa codificadas por los genes ENA1-4 [28], aunque también por el antiportador Na⁺/H⁺ Nha1. ENA2, 3 y 4 se expresan de forma constitutiva [29] mientras que la expresión de ENA1 es inducida por sodio, litio y pH alcalino, y está regulada por la actividad de la fosfatasa calcineurina [30]. Una mutación de pérdida de función en ENA1 causa sensibilidad a pH alcalino, siendo un fenotipo que se acentúa tras la adición de sodio [31]. Además Ena1 y Nha1 actúan de manera complementaria en función del pH medio para mantener las concentraciones intracelulares de sodio y potasio [24].

La concentración de cationes dentro de las células de la levadura probablemente no es homogénea, y existen diferencias significativas en los niveles de sodio y potasio entre el citosol y los orgánulos celulares [32]. La necesidad fisiológica de un transporte intracelular de cationes a través de las membranas de los orgánulos está conectada con el mantenimiento de una homeostasis de potasio y una detoxificación de sodio del citosol, así como la regulación de pH y el volumen de los orgánulos. El transporte de iones a la mitocondria se realiza a través del antiportador Mkh1 (K⁺/H⁺), también denominado Mdm38 [33]. El gen KHA1 codifica un transportador intracelular K⁺/H⁺ [8]

localizado en el aparato de Golgi, que es importante en la regulación del pH intracelular y la homeostasis de potasio [34]. Otro antiportador Na^+/H^+ es el codificado por el gen *NHX1*, implicado en la regulación del pH citoplasmático mediante la internalización de sodio en la vacuola, que funciona introduciendo el sodio en este orgánulo con el fin de mantener también un nivel citoplasmático de Na^+ que permita un desarrollo normal del metabolismo celular (10^{-2} - 10^{-3}M) [35]. En la vacuola se localiza un antiportador de K^+ , Na^+/H^+ *Vnx1* que está implicado en la regulación de la homeostasis iónica y en el mantenimiento del volumen celular [36].

1.2.3 Homeostasis de cationes en *A. nidulans*

A. nidulans es el organismo donde el sistema de regulación por pH ambiental ha sido estudiado en mayor profundidad. Los genes que se expresan preferentemente a pH ácido se les denomina genes “ácidos”, como por ejemplo la permeasa de GABA (*gabA*), o la fosfatasa ácida, *pacA* [37]. Los genes que se expresan preferentemente a pH alcalino se les denomina genes “alcalinos”, como los genes de la fosfatasa alcalina *palD* [38] o los genes *acvA* e *ipnA*, que codifican para la δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa y la isopenicilina N-sintasa, respectivamente, las dos primeras enzimas de la ruta de biosíntesis de la penicilina [39,40].

Los estudios pioneros que posteriormente condujeron al análisis de la regulación por pH en *A. nidulans* fueron llevados a cabo por el Dr. Gordon Dorn [41]. En ellos, seleccionó un gran número de mutaciones que afectaban la actividad de las fosfatasas ácida y/o alcalina, y a los que denominó con el acrónimo *pac*- y *pal*-, respectivamente.

La revisión de este trabajo por el grupo del Dr. Herbert Arst permitió establecer que parte de los genes descubiertos por Dorn pertenecían a un sistema de regulación de la expresión génica en respuesta al pH ambiental [37,42,43].

Los datos genéticos permitieron generar un modelo de este sistema regulador por pH ambiental, en el que el producto del gen *pacC* es el regulador directo de la expresión génica, funcionando como represor de los genes que se expresan preferentemente a pH ácido (*pacA* y *gabA*) y como activador de los genes que se expresan preferentemente a pH alcalino (*palD*, *ipnA* y *prtA*). Los productos de los genes *pal* formarían parte de la vía de transducción de señal encargada de activar a PacC en respuesta a la alcalinización del medio. De esta manera, en medio a pH ácido, PacC se encontraría en una forma inactiva, produciéndose una falta de represión de los genes “ácidos”. Al alcalinizarse el medio, los productos de los genes *pal* activarían a PacC, el cual pasaría a reprimir la expresión de los genes “ácidos” y a activar la de los “alcalinos” [43].

Se han detectado homólogos de PacC en todos los genomas de hongos filamentosos y levaduras conocidos hasta ahora, lo que da una idea de la importancia del sistema regulador controlado por PacC. PacC es un factor de transcripción que posee un dominio de unión a DNA formado por tres dedos de zinc del tipo Cys₂His₂ [44,43]. Al igual que la gran mayoría de factores de transcripción, la actividad transcripcional de PacC está regulada. En condiciones de ausencia de señal (pH ácido) PacC está aparentemente inactivo [45,46], siendo necesarios mecanismos moleculares que ayuden a mantener esa situación a pH ácido y que posteriormente, tras la alcalinización del medio, activen las funciones transcripcionales de PacC [45,47]. Estos mecanismos han sido estudiados en detalle, e incluyen interacciones intramoleculares, interacciones con

otras proteínas, cortes proteolíticos regulados [45,47,48] y cambios de la localización subcelular de PacC [49].

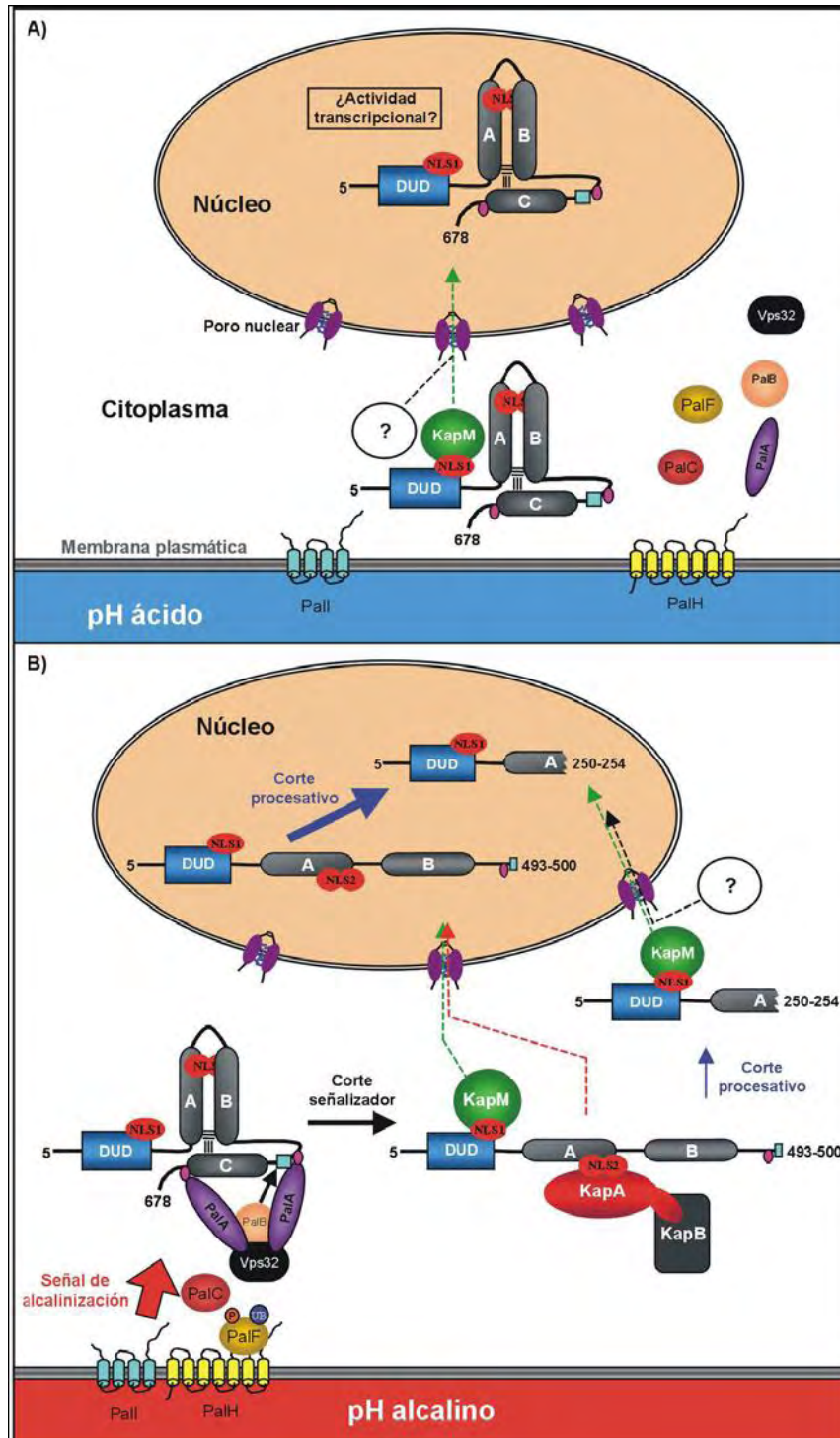


Figura I3: Modelo de la regulación de los genes implicados en el crecimiento bajo condiciones extremas de pH. A) Regulación en condiciones de pH ácido en el medio. B) Regulación en condiciones de pH alcalino del medio.

INTRODUCCIÓN

En el estudio de la homeostasis de cationes en *A. nidulans* se han identificado dos genes que codifican para factores de transcripción implicados en la resistencia a elevadas concentraciones de distintas sales. En primer lugar se ha identificado al gen *sltA* cuya delección da lugar a una elevada sensibilidad a diferentes cationes y a pH alcalino [94]. Además se identificó un homólogo al gen que codifica para la proteína CRZ1 en *S. cerevisiae*, CrzA [50]. Esta proteína se trata de un factor de transcripción que modula la regulación de genes mediada por calcio. La delección de este gen también da lugar a una sensibilidad a pH alcalino.

La alcalinización del medio debe ser un estímulo muy agresivo para *A. nidulans* al que debe responder con, al menos, tres rutas reguladoras mediadas por estos factores transcripcionales. Este nexo establece la relación entre el control sobre la homeostasis de iones en el hongo y el pH extracelular, algo que se sospechaba desde los primeros momentos del estudio del sistema regulado por PacC.

Como muchos microorganismos, el ascomiceto *A. nidulans* necesita solo pequeñas cantidades de calcio para crecer, fácilmente suplementadas por trazas de contaminación de los componentes del medio de cultivo. Este hecho causa que la manipulación de la disponibilidad de calcio sea difícil y complica el estudio de la señalización y homeostasis de calcio. Sin embargo, una combinación de mutaciones de pérdida de función en los genes *halA* y *sltA* que codifican para una proteína quinasa (HalA) y un factor de transcripción (SltA) da lugar a un fenotipo en la cepa de elevado requerimiento de calcio, que se ha denominado auxotrofía de calcio [50]. Este requerimiento de calcio no es total, y puede verse aumentado por elevadas concentraciones de sodio y potasio. Como se describe en esta tesis, HalA se descubrió como un supresor del sistema de pH ambiental y establece una relación con el sistema

de respuesta a altos niveles de sal también a través de una interacción genética con *SltA*, a nivel de la homeostasis de calcio. Respecto a la homeostasis de calcio, el descubrimiento que mutaciones de pérdida de función en *NhaA*, un homólogo del antiportador Na^+/H^+ de membrana *Nha1* de *S. cerevisiae* o una mutación, posiblemente de ganancia de función, en un transportador de potasio (*trkB*, ver esta tesis) suprimen la auxotrofía de calcio establece una clara relación entre la regulación de los niveles internos de ciertos cationes monovalentes y el calcio en *A. nidulans* [50]. En ausencia de calcio añadido, las mutaciones en *sltA* dan lugar a una hipertrofia del sistema vacuolar, incrementando los niveles de *pmcA* y *pmcB*, genes codificantes para ATPasas de calcio de la membrana vacuolar [50].

1.3 TRANSPORTADORES DE POTASIO

1.3.1 Generalidades

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que forman poros permitiendo la difusión pasiva de iones a través de las membranas biológicas. Los canales de potasio están constituidos por 4 subunidades α que se encargan de formar físicamente dicho poro. A menudo estas subunidades α pueden estar acompañadas de otras subunidades auxiliares β . Las subunidades auxiliares intervienen en la modulación de la actividad del canal y también en la correcta expresión del canal en la superficie de la membrana [51]. En cada genoma secuenciado hasta el momento existe al menos un gen que codifica para un canal de potasio, incluso en los microorganismos más simples como *Escherichia coli* [52]. Se hipotetiza que el resto de canales iónicos se han originado mediante divergencia evolutiva de los canales de potasio [53]. Los canales de potasio forman la familia de canales iónicos más diversa en mamíferos, habiéndose

descrito hasta 75 genes implicados. Además, mediante mecanismos como el procesamiento diferencial del ARN mensajero en la transcripción y como las variaciones en las subunidades que forman el canal, incluyendo sus proteínas accesorias, se consigue aun más diversidad en la capacidad y especificidad de transporte de este catión [54].

Debido a que, por norma general, las células mantienen la concentración de potasio en el interior de la membrana mucho más alta que en el exterior, la apertura de los canales de potasio produce un cambio eléctrico a través de la membrana, produciendo una hiperpolarización de la célula. Esta hiperpolarización tiene unas consecuencias muy obvias en las células eléctricamente excitables, ya que finalizan el potencial de acción en neuronas, en células cromafines adrenales, en músculo y en células pancreáticas b. Pero además los canales de potasio intervienen en otras múltiples funciones en células no excitables eléctricamente. En células del epitelio renal intervienen en el balance osmótico. En linfocitos T y B la hiperpolarización es un requisito para la mitosis y la proliferación en la respuesta inmune [55]. En los eritrocitos sirven para mantener la forma de la célula y para regular el volumen. Y en plantas regulan el flujo osmótico para el intercambio de gas y agua de las hojas [53].

Los canales de potasio se pueden dividir según los mecanismos de apertura del canal en canales dependientes de voltaje y canales dependientes de ligando. En los canales dependientes de ligando, el poro se abre por la unión de: (1) un ion (por ejemplo calcio), (2) pequeñas moléculas orgánicas o (3) una proteína. Por esta razón los canales dependientes de ligando tienen un dominio citoplasmático o extracelular para unirse a estos efectores. En los canales de potasio dependientes de voltaje la energía para abrir el poro proviene del movimiento dentro de la membrana de un sensor con carga eléctrica.

Los canales dependientes de voltaje poseen dominios transmembrana que se encargan de detectar las diferencias en el voltaje [56].

La Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) ha propuesto una nomenclatura estándar basándose en los árboles filogenéticos [57]. La nueva propuesta de nomenclatura agrupa los canales de potasio en primer lugar por su estructura y en segundo lugar por sus relaciones filogenéticas. Así existirían hasta 4 grupos diferentes: (1) canales de potasio dependientes de voltaje, (2) canales de potasio sensibles a calcio, (3) los canales de potasio con 2 poros y (4) los canales de potasio rectificadores internos (“inward rectifier”).

Estructura de los canales de potasio

En 1998 Doyle y colaboradores publicaron la estructura del canal de potasio KcsA procedente de *Streptomyces lividans*, mostrando la estructura del poro del canal de potasio en tres dimensiones [58]. Se ha comprobado que esta estructura tridimensional del poro está evolutivamente muy conservada entre los diferentes organismos y que es, además, la que determina la enorme selectividad de estos canales por el ión potasio.

Casi al mismo tiempo Kreusch y colaboradores (1998) presentaron la estructura de otro dominio muy importante para los canales de potasio [59]. Se trata del dominio de tetramerización que permite la asociación de las 4 subunidades necesarias para formar canales de potasio funcionales. A partir de este momento se consiguió la estructura de otros 3 canales de potasio más. En primer lugar fue la estructura de un

INTRODUCCIÓN

canal de potasio activado por calcio y la de un canal dependiente de voltaje [60] y por último se presentó la estructura de un rectificador interno [61].

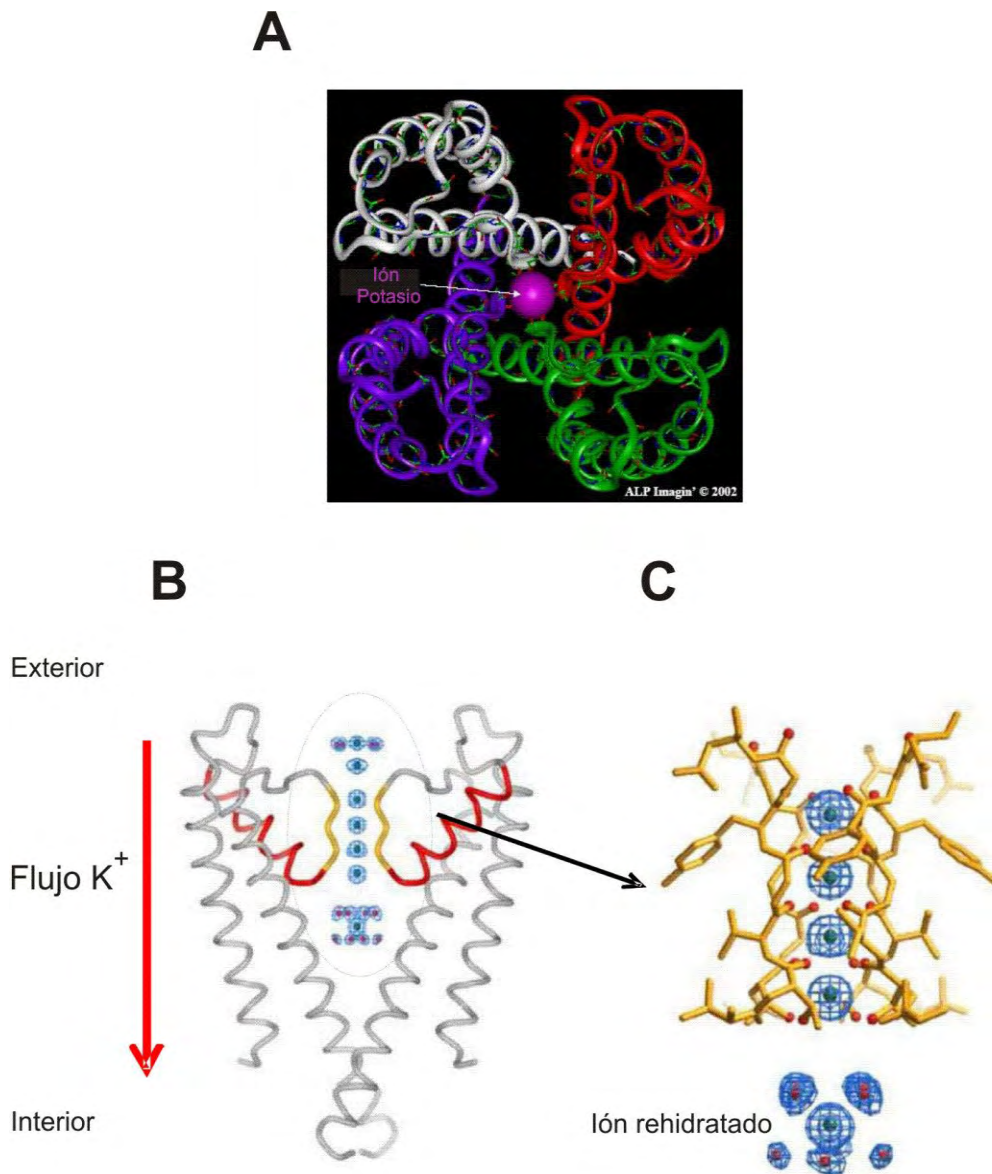


Figura I4: **A)** Estructura del canal de potasio con sus 4 subunidades representadas en cuatro colores diferentes. Cada una de estas subunidades está formada por dos dominios transmembrana. **B y C)** Estructura del poro de conducción de iones y del filtro selectivo de los canales de potasio (imagen tomada de [56]). En **B** se muestra la estructura del poro representando 2 de las 4 subunidades que lo forman y con la parte extracelular en la parte superior. Cada subunidad contiene (desde el lateral hacia el centro de la figura) una hélice externa cercana a la membrana, una hélice interna cercana al poro, la hélice del poro y el filtro selectivo. En **C** se muestra una imagen ampliada del filtro, donde se pueden observar los iones de potasio y cómo se ajusta la estructura proteica sobre ellos, estabilizándolos en el interior de la membrana. En la parte interior se observa cómo se rehidratan los iones al alcanzar la cavidad central del poro que se encuentra llena de agua.

Las dos partes principales de los canales de potasio son:

- Dominio de agrupación de subunidades T1: Éste es un dominio que determina las subunidades que se asocian para formar los canales funcionales, en él reside la capacidad de las subunidades para unirse entre sí. Tiene una gran importancia funcional puesto que el ensamblaje heteromérico de subunidades de canales de potasio es un mecanismo muy importante para producir diversidad en estos canales [62]. Basándose en la estructura cristalina de este dominio se piensa que puede tener una función en la permeabilidad del canal. Los 4 dominios T1 procedentes de las 4 subunidades que forman el canal se unen formando una estructura similar a un embudo (figura I4B, en color rojo), con un ensanchamiento previo a lo que sería el canal del poro en sí mismo. De ser así, los iones de potasio tendrían que pasar este supuesto embudo en primer lugar para salir de la célula.
- Poro de conducción de los iones: Hay que hacer constar que la fuerte selectividad de los canales de potasio por su ion se consigue sin comprometer la velocidad de conducción del poro, que se aproxima al límite de difusión para ese ion [56]. El poro de los canales de potasio se forma por la unión de 4 subunidades que forman una vía de conducción de iones en el centro (figura I4). La parte central de esta vía consiste en una cavidad ocupada por moléculas de agua. Hacia el exterior de la cavidad central se sitúa el filtro que condiciona la selectividad por los iones de potasio (figura I4B), este filtro se forma por una región del canal que está muy conservada a lo largo de la evolución. En este filtro los iones se encuentran deshidratados y se mantienen estabilizados por 8 átomos de oxígeno que forman una

estructura a su alrededor similar a la que forma el agua, así el ion se encuentra como si estuviera en solución. El filtro posee 4 lugares de unión para iones de potasio situados en fila. Los iones se unen a estos lugares de forma alternada con moléculas de agua, de modo que en el filtro siempre se encuentran como máximo 2 iones. Los iones y las moléculas de agua se van desplazando en fila y cuando sale un ion del filtro entra otro por la parte opuesta. Por supuesto la dirección del flujo de iones viene determinada por el gradiente electroquímico para potasio.

1.3.2 Transportadores de potasio en levaduras

La toma de potasio en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* está mediada principalmente por el sistema TRK, codificado por dos genes parcialmente redundantes, *TRK1* y *TRK2* [63,27]. Además se conoce que el sistema TRK es uno de los principales determinantes del potencial eléctrico de la membrana plasmática [64]. El gen *TRK1* codifica el transportador más activo, una proteína de 1.235 aminoácidos, con 8 dominios transmembrana y 4 estructuras MPM (membrana-poro-membrana) [63] (figura I5). Trk1 es una proteína integral de la membrana plasmática. Como muchos transportadores de la membrana plasmática, se encuentra asociada a las fracciones de membrana resistentes a detergentes [65]. Estas fracciones de membrana están enriquecidas en esfingolípidos que contienen inositol y en ergosterol, el principal esteroide estructural de los hongos [66]. Se ha descrito que estos esfingolípidos participan en el tráfico de proteínas a la membrana plasmática [67].

El gen *TRK1* de *Saccharomyces cerevisiae* fue el primer gen codificante de un transportador de potasio clonado en células eucariotas [63]. El gen *TRK2* fue [18]

identificado y clonado en *S. cerevisiae* posteriormente [18]. Las proteínas Trk1 y Trk2 son idénticas en un 55% de su secuencia aminoacídica, y el grado de similitud es aún mayor en los segmentos hidrofóbicos, donde puede alcanzar el 90%. Sin embargo, el papel del gen *TRK2* solo parece ser importante en el mutante nulo para el gen *trk1*, a pesar de que ambos sistemas tienen afinidades similares por el ión potasio ($K_m = 20 - 50 \mu\text{M}$) y por el ión rubidio ($K_m = 0,1 - 0,3 \text{ mM}$) [27].

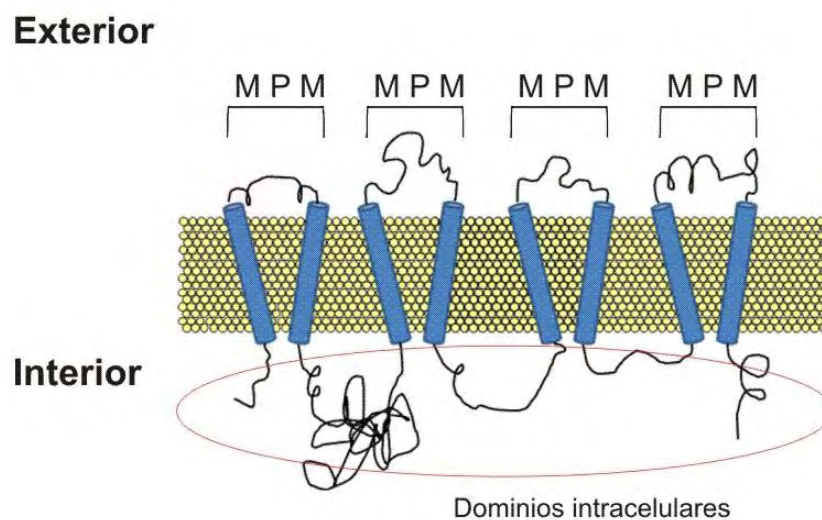


Figura I5: Representación esquemática de los transportadores TRK-HKT basada en la estructura MPM de los dominios trans-membrana. La parte superior se corresponde con la cara externa de la membrana plasmática.

Utilizando una sonda correspondiente a la región conservada de los genes *TRK1* y *TRK2* de *S. cerevisiae* se identificó un gen homólogo en *Schizosaccharomyces pombe* [68]. En el proyecto de secuenciación del genoma de *S. pombe* se identificó un segundo gen de la misma familia, correspondiente a *TRK2*. Los genes *TRK1* y *TRK2* de *S. pombe* codifican proteínas de 841 y 881 aminoácidos respectivamente, mostrando un mayor parecido al gen *TRK2* que al gen *TRK1* de *S. cerevisiae*. También se han encontrado transportadores del tipo TRK en *Neurospora crassa* [69], *Schwanniomyces occidentalis*

INTRODUCCIÓN

[22] y *Debaryomyces hansenii* [70]. En estas especies, además de los sistemas de transporte del tipo TRK, también están presentes otro tipo de transportadores de potasio, los HAK (*High-Affinity K⁺-transporter*), que no existen en *S. cerevisiae*. En los proyectos genoma, tanto de arroz, como de *Arabidopsis thaliana*, se han encontrado transportadores del tipo HKT/TRK. En arroz se ha visto que hay 8 transportadores HKT/TRK, mientras que en *Arabidopsis* sólo se ha encontrado uno, y se ha visto también que los distintos transportadores de esta familia pueden variar su afinidad por sodio o potasio [29]. También se ha observado que los transportadores TRK de levadura están relacionados con un gran número de transportadores de bacteria, los transportadores llamados KtrB (anteriormente NtpJ) y los transportadores TrkH [71].

En *S. cerevisiae*, se han identificado otros transportadores de la membrana plasmática que contribuyen a la regulación de las concentraciones intracelulares de potasio [23]. En condiciones específicas, por ejemplo estrés por KCl, el potasio puede ser exportado de las células de forma activa a través de las ATPasas Ena/Pmr2, o por el antiportador Nha1. Estos sistemas de extrusión de potasio también son capaces de transportar otros cationes además del sodio, como por ejemplo el litio [22,31].

Existe otro transportador en la membrana plasmática que es específico para potasio, el canal Tok1. Las propiedades biofísicas de este canal de potasio han sido descritas con detalle [72], pero su papel fisiológico aún no se ha caracterizado completamente. Tok1 es un canal de potasio dependiente de voltaje con dos dominios de poro en tándem [73]. Normalmente tiene una fuerte actividad de extrusión, pero se ha descrito que bajo ciertas condiciones también es capaz de mediar la toma de potasio [72,25]. Tok1 se activa por despolarización de la membrana plasmática [21], y probablemente libera el potasio acumulado en las células para regenerar el potencial de membrana [74]. También se ha demostrado que Tok1 puede ser fosforilado por la [20]

quinasa Hog1, lo que sugiere que este canal está participando en la respuesta a estrés osmótico, probablemente mediando la salida de potasio durante la fase inicial del estrés [75]. La regulación de la actividad del sistema TRK afecta a la concentración intracelular de potasio y a la turgencia de las células [76], al potencial eléctrico de membrana [77], y al pH intracelular [78].

La principal diferencia entre Trk1 y Trk2 se encuentra entre el primer y el segundo motivo MPM, in Trk1 el lazo tiene una longitud de 642 aminoácidos mientras que en Trk2 la longitud es de 326. Curiosamente la mayoría de los transportadores Trk identificados en otras levaduras se parecen más a la estructura de Trk2 que a la de Trk1 [32]. En principio no se ha demostrado la existencia de un complejo entre los dos Trks aunque siempre se hable de un sistema Trk1-Trk2. Trk2 se propone como responsable de la entrada de potasio [18]. Se asume que Trk1 es el responsable del transporte de alta afinidad y Trk2 del de baja afinidad [18], sin embargo este modelo está muy simplificado ya que se ha demostrado que Trk2 puede ser responsable de transporte de afinidad moderado/alto [19] y por otro lado existe un transporte residual de potasio en cepas carentes de ambos transportadores [64]. En cepas silvestres, la mayoría de la entrada de potasio está mediada por Trk1, que puede funcionar como transportador de alta/baja afinidad dependiendo del estado de potasio en la célula. Trk2 puede transportar potasio también de forma de alta y baja afinidad, pero el gen está pobremente expresado en condiciones estándar [32].

Esta tesis doctoral aporta información sobre la identidad de los posibles transportadores de potasio en el organismo modelo *A. nidulans* y sobre los mecanismos que regulan el transporte de este catión en el hongo.

1.4 REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE POTASIO

1.4.1 Regulación del transporte en levaduras

Estudios genéticos llevados a cabo en levadura han identificado varias proteínas implicadas en la regulación del transporte de potasio. Por ejemplo, la proteína fosfatasa Ppz1 desactiva Trk1, y es a su vez desactivada por una subunidad inhibidora, Sis2/Hal3 [79,78]. Se ha descrito otra fosfatasa, calcineurina (Cnb1), como necesaria para la activación de Trk1 y Trk2 por estrés causado por sodio [76]. Otras proteínas implicadas en la regulación del transporte de potasio son la proteína quinasa Sky1 [80], la proteína inducida por estrés osmótico Hal1 [81], la proteína G de la superfamilia Ras Arl1 [82], y las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 [77] cuya función parece estar relacionada con la regulación positiva del sistema Trk1-Trk2 y que van a ser descritas con mayor detalle a continuación. Cada uno de estos transportadores de la membrana plasmática debe ser regulado de manera específica para permitir la viabilidad de las células en respuesta a los cambios que se producen en el medio ambiente. Esta regulación puede darse a distintos niveles. Algunos transportadores se regulan a nivel transcripcional, mientras que para otros son más importantes las modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación o la ubiquitinación.

Una de las estrategias de señalización de las células eucariotas en respuesta a estrés es utilizar cascadas de fosforilación de MAPK (*mitogen activated protein kinase*). La adaptación al estrés osmótico requiere la activación de una cascada de fosforilación que termina con la activación de la MAPK Hog1. Esta forma activa de la proteína Hog1 se desplaza hasta el núcleo, donde por fosforilación de al menos tres factores de transcripción distintos (Sko1, Hot1 y Smp1), promueve la modificación en el patrón de expresión de más del 10% del genoma de la levadura *S. cerevisiae* [83].

Otro proceso clave de regulación de los transportadores de la membrana plasmática es la ubiquitinación. La ubiquitinación es una modificación post-traducciona en la que se adiciona a la proteína una unidad o una cadena de ubiquitina, un polipéptido de 76 aminoácidos, marcando así su destino en la célula o su posterior degradación [84]. Así, la ubiquitinación es un paso necesario para la degradación de algunas proteínas de la membrana plasmática como el receptor del factor α , Ste2 [85], y la permeasa de uracilo Fur4 [86]. La ubiquitinación promueve la regulación negativa de estas proteínas, ya que sirve como señal para su internalización en la vía endocítica que finaliza con la degradación en la vacuola. Del mismo modo que la actividad de las permeasas de nutrientes está regulada por el entorno, debe producirse también una estricta regulación de los transportadores de iones. El mantenimiento de la homeostasis iónica en respuesta a los cambios que se producen en el medio ambiente es vital para las células. En muchos casos, el delicado balance entre los distintos iones está determinado por la expresión específica de los genes que codifican los canales, las bombas y los transportadores iónicos. Sin embargo, en los últimos años, se ha visto que la modificación post-traducciona de estas proteínas, especialmente la fosforilación, también juega un papel fundamental en la regulación de la homeostasis iónica [87,75].

Se han descrito algunos ejemplos de regulación dependiente de fosforilación para las actividades de algunos canales y bombas de iones, como por ejemplo los canales dependientes de voltaje $Kv_{3,4}$ y los rectificadores internos de potasio IKr, pero en el caso de transportadores la información es menor [88,89]. Recientemente se ha mostrado que un transportador de anión nitrato de *Arabidopsis* puede cambiar su afinidad mediante la fosforilación de un residuo de treonina [90]. Este papel de la fosforilación en la regulación de la homeostasis iónica implica la existencia de rutas de transducción de señales, en las que quinasas y fosfatasas actúan sobre sustratos en

INTRODUCCIÓN

respuesta a distintos estímulos percibidos por las células. En la mayoría de los casos estas rutas de transducción de señales no se han caracterizado, pero parecen tener una importancia vital en el mantenimiento de la homeostasis iónica, especialmente en respuesta a los cambios producidos en el medio ambiente.

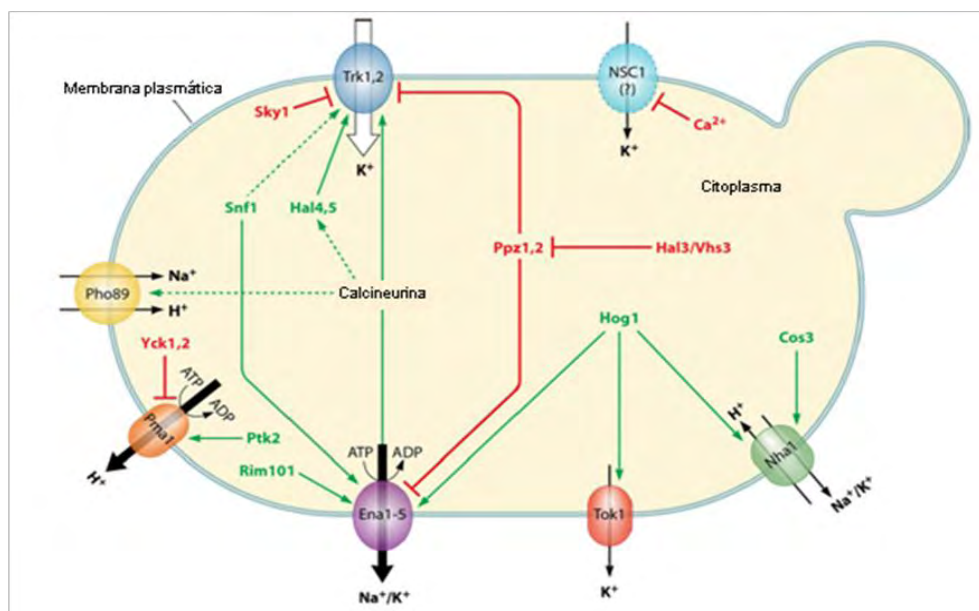


Figura I6: Mecanismos conocidos de regulación de los diferentes transportadores de membrana. Las líneas discontinuas indican interacciones que no están totalmente documentadas. Adaptado de [32].

1.4.2 Papel de las quinasas Hal4 y Hal5 en levaduras.

La regulación de la actividad del sistema Trk afecta a la concentración intracelular de potasio y a la turgencia de las células [91], al potencial eléctrico de membrana [77], y al pH intracelular [78]. La actividad de los transportadores Trk1 y Trk2 está regulada positivamente por las proteínas quinasas Hal4 y Hal5 [92].

Las proteínas Hal4/Sat4 y Hal5 son dos serina/treonina quinasas parcialmente redundantes que fueron identificadas por su capacidad de conferir tolerancia a salinidad (*halotolerancia*) por sobre-expresión en *S. cerevisiae* [77].

Estudios genéticos han postulado que estas dos quinasas actúan regulando de forma positiva el sistema de transporte de potasio Trk1-Trk2. Esta hipótesis está basada en la observación de que la disrupción de los genes *HAL4* y *HAL5* da lugar a un fenotipo muy parecido al del mutante *trk1 trk2*, y de que el mutante *hal4 hal5* requiere la adición de potasio para crecer en medio mínimo. Además, la sobreexpresión de los genes *HAL4* y *HAL5* sólo es capaz de conferir tolerancia a salinidad en cepas en las que estén presentes los transportadores de potasio Trk1 y Trk2 [77].

El aumento de la actividad transportadora de potasio producido por estas quinasas, incrementa la entrada de potasio y reduce el potencial de membrana, lo que reduce a su vez la captación de cationes tóxicos e incrementa la tolerancia a sal [77].

También se ha observado como existe una regulación de la actividad transportadora de potasio mediada por estas proteínas quinasas en la levadura *S. pombe*. En esta levadura se ha identificado un homólogo a la proteína quinasa Hal4 de *S. cerevisiae*, denominado igualmente Hal4 [93]. La delección de esta proteína da lugar a una hiperpolarización de la membrana plasmática, sugiriendo una función conservada en homeostasis salina y en el mantenimiento del potencial de membrana. En esta levadura se ha visto como los transportadores Trk son fosforilados cuando en el medio de cultivo la concentración de potasio es baja, y esta fosforilación se mantiene en mutantes nulos para la proteína quinasa Hal4, sugiriendo la implicación de otras quinasas adicionales en este proceso [93].

1.4.3 Regulación transcripcional frente a estrés catiónico en *A. nidulans*.

Para investigar la homeostasis de cationes en *A. nidulans* se caracterizaron dos genes que codificaban para factores de transcripción. El ortólogo del gen *crz1* en *S.*

cerevisiae, *crzA*, que codifica un factor de transcripción que media la regulación de genes por calcio fue identificado y caracterizada su función [94]. Los fenotipos de la delección de *crzA* incluyen extremada sensibilidad a pH alcalino y toxicidad por calcio. Una versión funcional de CrzA etiquetada en el extremo C-terminal con GFP fue analizada al microscopio de fluorescencia. Esta proteína es excluida del núcleo en ausencia de calcio añadido, pero rápidamente se acumuló en el núcleo tras la adición de calcio extracelular. Además, el gen previamente caracterizado *sltA*, que no tiene homólogo identificado en levaduras, fue delecionado y el fenotipo resultante incluía sensibilidad a un número de cationes además de a la alcalinización del medio de cultivo. Una baja expresión de la ATPasa de sodio ENA puede explicar parcialmente la sensibilidad a cationes de las cepas nulas de *sltA* [94].

Los dos factores de transcripción analizados están implicados en la prevención de la toxicidad de ciertos cationes. En ausencia de SltA, un factor de transcripción específico de hongo filamentosos, *A. nidulans* es extremadamente sensible a la toxicidad por sodio, potasio, litio, cesio y magnesio, pero no a elevadas concentraciones de calcio [94]. Mientras que la ausencia de CrzA incrementa la sensibilidad al calcio. Estos resultados ponen de manifiesto diferencias significativas entre *A. nidulans* y *S. cerevisiae* en la regulación del estrés catiónico [50,94]. SltA parece tener un doble papel, por un lado positivo en la regulación de EnaA y por otro lado negativo sobre la expresión de VcxA, un putativo transportador vacuolar de calcio [94]. El factor de transcripción PacC, que media el control de la expresión de genes dependientes de pH, actúa como activador y como represor, pero su homólogo en *S. cerevisiae*, Rim101p, no actúa en ese modo [42].

El papel concreto de estos reguladores transcripcionales sobre la expresión de la batería de canales y transportadores de cationes descrita en *A. nidulans* se desconoce en su mayor parte. Este estudio constituye una primera aproximación a la identificación de elementos reguladores y estructurales (transportadores) del sistema de homeostasis de cationes en este hongo filamentoso modelo.

1.5.- Antecedentes al trabajo elaborado en esta tesis doctoral.

El trabajo de investigación realizado en la tesis doctoral del Dr. Fernández-Martínez [95] se centró en los mecanismos y señales que gobernaban la localización nuclear del factor de transcripción PacC [96]. Durante un proceso de selección de mutantes en el sistema de regulación por pH ambiental utilizando la denominada “Técnica del GABA” [97] se aislaron cepas mutantes en las que se alteraba la localización celular de PacC. Estos mutantes eran supresores del fenotipo constitutivo que causaba el alelo *pacC*⁷⁰⁰. El fundamento de esta técnica es la regulación directa, negativa, por PacC de la expresión del gen *gabA*, que codifica para la permeasa del ω -aminoácido γ -aminobutirato (GABA). El GABA puede ser utilizado como única fuente de carbono o de nitrógeno por *A. nidulans*, y esta capacidad depende de la correcta expresión y funcionalidad de la permeasa codificada por *gabA*. El alelo *pacC*⁷⁰⁰ reprime constitutivamente la expresión de *gabA* imposibilitando así el crecimiento de esta cepa mutante en el medio conteniendo GABA como única fuente de nitrógeno.

La proteína codificada por este alelo mutante de PacC, *pacC*⁷⁰⁰, consta de la proteína fluorescente verde (GFP) unida al extremo amino terminal de una forma truncada de PacC en el aminoácido 250 que mimetiza la forma PacC27kDa.

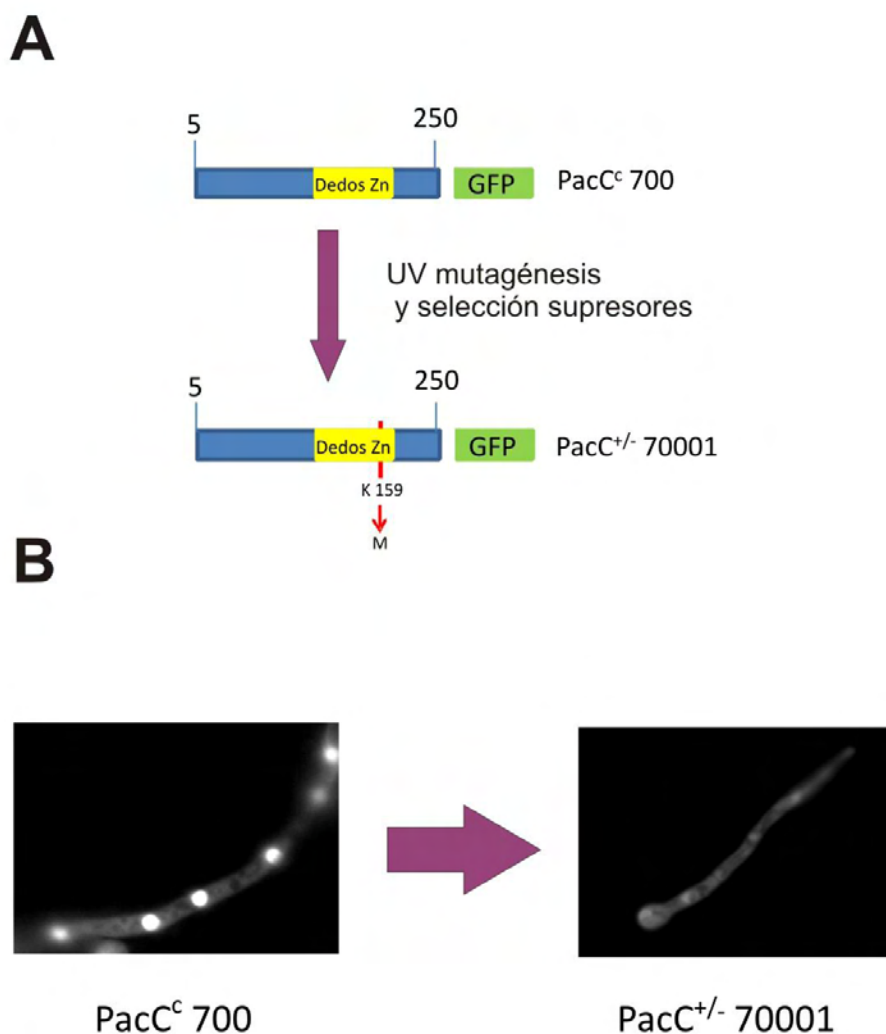


Figura I7: A) Representación esquemática de la quimera PacC^c700 y del mutante PacC^{+/-}70001 obtenido a partir de esta. B) Imágenes de microscopía de fluorescencia de la cepa que expresa la forma funcional constitutiva de PacC, PacC27kDa=PacC^c700 (MAD1400), en la que se aprecia acumulación de fluorescencia en los núcleos, y de la cepa mutante PacC^{+/-}70001 (MAD997) que tiene afectada la localización preferentemente nuclear de PacC, y la fluorescencia se encuentra dispersa en el citoplasma.

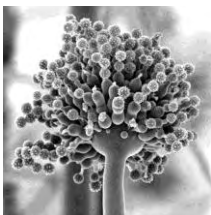
La cepa MAD1400 expresa la quimera fluorescente GFP::PacC(5-250) y conidias de esta cepa fueron sometidas a un proceso de mutagénesis por irradiación con luz ultravioleta y se seleccionaron los mutantes de pérdida de función en PacC utilizando la técnica del GABA. GFP::PacC5-250 tiene una localización preferentemente nuclear (figura I7, PacC^c700). Entre los mutantes supresores obtenidos

se observaron algunos que pertenecían a una de las clases esperadas, la que debía mostrar afectada la localización preferentemente nuclear de PacC (figura I7, $PacC^{+/-70001}$).

De entre los supresores de $pacC^{c700}$ seleccionados se identificaron y caracterizaron en mayor detalle tres cepas que mostraban la pérdida de la preferente localización nuclear de la quimera GFP::PacC27kDa. Posteriormente se determinó la presencia de sustituciones en determinados aminoácidos que forman parte del dominio de unión al DNA. Los alelos $pacC^{+/-70001}$ (K159M), $pacC^{c/-70010}$ (F151S) y $pacC^{+/-70011}$ (K158E) portan mutaciones que causan la sustitución de residuos del tercer dedo de zinc de PacC, el más conservado en secuencia entre todos los homólogos de PacC. Las mutaciones $pacC^{+/-70001}$ y $pacC^{+/-70011}$ permitieron definir la señal de localización nuclear presente en el tercer dedo de zinc [98,96].

Este trabajo tiene como origen un segundo proceso de selección de mutaciones supresoras, esta vez, del fenotipo de pérdida de función causado por el alelo $pacC^{+/-70001}$ (ver descripción en el primer apartado de resultados y esquema del proceso en la figura R1).

OBJETIVOS



2.- OBJETIVOS

En esta tesis doctoral se aborda el estudio de uno de los posibles mecanismos de regulación implicado en la homeostasis de cationes en *Aspergillus nidulans*. Éste es un proceso básico para la supervivencia del hongo en ambientes con concentraciones anormales, normalmente elevadas, de cationes. El trabajo realizado en esta memoria es pionero en este campo puesto que solo se habían realizado estudios "in sílico" sobre la maquinaria genética implicada en la homeostasis de cationes en este organismo modelo.

Para llevar a cabo este estudio, se fijaron tres objetivos concretos:

- Estudio de la mutación que causa resistencia al anión molibdato, MoR24, para determinar así el papel del gen en el que se localiza, *halA*, en el sistema de regulación por pH ambiental en *A. nidulans*.
- Caracterización del papel de la proteína quinasa HalA en la homeostasis de cationes.
- Identificación de los transportadores de potasio extracelular, Trk, en *A. nidulans*, análisis por genética en reverso de su función y estudio de su regulación por HalA.

MATERIALES Y MÉTODOS



3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

3.1.1.) Medios y suplementos para *Aspergillus nidulans*.

La solución de sales, elementos traza y suplementos utilizados en los medios de cultivo se describen en este apartado 1 de materiales y métodos. Los cultivos se incubaron a 37°C, salvo indicación en contra, y con agitación orbital de 250 r.p.m. en el caso realizarse con medio líquido. Los cultivos en medio líquido se inocularon con 3×10^6 conidiosporas/mL. Los conidios se recolectaron rascando la superficie de las colonias con una espátula estéril y se resuspendieron en una solución acuosa de TWEEN 80 al 0,01% (v/v).

3.1.1.1.) Medio Mínimo de *Aspergillus* (MMA).

Para 1 litro de medio mínimo de *Aspergillus* (MMA) se diluyeron 20mL de solución de sales con agua Mili-Q y se ajustó el pH a 6,5 añadiendo una solución concentrada (10M) de NaOH. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Para preparar el medio mínimo sólido se añadió agar Oxoid al 1% (p/v) antes de su esterilización. Tanto al medio sólido como líquido, justo antes de ser utilizados, se añadieron los suplementos necesarios para el crecimiento de cada estirpe, así como la fuente principal de carbono y la de nitrógeno, generalmente D-glucosa 1% (p/v) y tartrato de amonio 5mM, respectivamente.

Para preparar medio de cultivo a pH ácido, se añadió NaH_2PO_4 a las concentraciones finales de 50 ó 100 mM, según se indique en el experimento resultando en un valor de pH en el rango de 5-5,5. El medio de cultivo tamponado a pH alcalino se obtuvo añadiendo Na_2HPO_4 hasta una concentración final de 100 mM, resultando el pH

del medio ajustado a valor a un valor aproximado de 8. El medio de cultivo a pH neutro se obtuvo mediante la adición de fosfato monosódico y fosfato disódico a una concentración final de 50 mM cada uno, resultando el valor final de pH en el medio de 6,5.

Para el análisis al microscopio de fluorescencia de las distintas estirpes, se utilizó una versión del MMA líquido denominada “*watch minimal medium*” (WMM) [99]. Para prevenir la formación de precipitados de sales que interfieren en microscopía, este medio carece de sales de fosfato antes de ser autoclavado y por lo tanto se suplementa con 25 mM NaH_2PO_4 antes de su utilización.

3.1.1.2.) Medio Mínimo de *Aspergillus* sin potasio (MMA- K^+).

Se preparó este medio de la misma forma que el MMA, pero eliminando el potasio presente en la solución de sales (Ver composición solución sales en el apartado 3.1.1.5). Para compensar el balance iónico del medio se añadió sodio en lugar de potasio en esta solución, sustituyendo el KCl por NaCl y el KH_2PO_4 por NaH_2PO_4 manteniendo la molaridad.

3.1.1.3.) Medio completo de *Aspergillus* (MCA).

Composición por litro: 20mL de solución de sales, 10mL de solución de casaminoácidos, 10g de D-glucosa, 2g de bactopectona y 1g de extracto de levadura. Se añadió agua hasta un litro y se ajustó el pH a 6,5 con una solución 10M de NaOH. Para el medio sólido se añadió agar al 1% (p/v). El medio de cultivo se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Antes de ser utilizado, se le añadió 10mL de solución de vitaminas/litro, la fuente principal de nitrógeno y, en caso de necesitarse,

los requerimientos adicionales específicos de cada estirpe ausentes de la solución de vitaminas.

3.1.1.4.) Medio de fermentación (MFA).

Este medio incluye como principal componente el CSL (*Corn Steep Liquor*). Se utilizaron los lotes Cerestar-2062 o Laisa-60015 a una concentración de 25 g/l. Antes de pesarse el CSL, se mezclaron bien las fases acuosa y sólida. Una vez pesado el CSL, se añadió el agua destilada y la solución de sales (20mL/l). Se agitó durante 20 minutos y se filtró a través de papel de filtro utilizando vacío. El pH se ajustó a valor 6,8 con NaOH (10M) y el medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 30 minutos. Posteriormente se le añadió como fuente de carbono principal 3% de sacarosa, como fuente de nitrógeno principal 5mM de tartrato de amonio y los suplementos específicos de cada estirpe.

3.1.1.5) Medio de regeneración (MMR)

En este medio se utilizan 20 mL de soluciones de sales y 342 g sacarosa (1M). Se añadió agua hasta un litro y se ajustó el pH a 6,8 con NaOH. Antes de esterilizar el medio en el autoclave se añadió agar Oxoid al 1,5%. En el momento que el medio fue utilizado se añadieron la D-glucosa 1%, el tartrato de amonio a 5mM y los suplementos necesarios para el crecimiento de las cepas.

3.1.1.6) Medio de regeneración-TOP (MMR-TOP)

En este medio se utilizan 20 mL de soluciones de sales y 342 g sacarosa (1M). Se añadió agua hasta un litro y se ajustó el pH a 6,8 con NaOH. Antes de esterilizar el medio en el autoclave se añadió agar Oxoid al 1,5%. En el momento que el medio fue

MATERIALES Y MÉTODOS

utilizado se añadieron la D-glucosa 1%, el tartrato de amonio 5mM y los suplementos necesarios para el crecimiento de las cepas.

3.1.1.7) Soluciones y suplementos para medios de *A. nidulans*.

- Solución de sales (solución concentrada 50x)

Para 1 litro:

KCl	26g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	26g
KH ₂ PO ₄	76g

- Solución de elementos traza sin sales de fosfato (solución concentrada 1000x)

Para 1 litro:

Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	40 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	400 mg
FeCl ₃	800 mg
ZnCl ₂	8.000 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	800 mg

- Solución de sales baja en concentración de fosfatos

Para 1 litro (solución concentrada 50x):

KCl	26 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	26 g
KH ₂ PO ₄	76 g
Solución de elementos traza sin fosfatos	50 mL

-Solución de casaminoácidos.

Hidrolizado de caseína 150g/l. Esterilizar en autoclave 110°C, 20 minutos. Se utilizó como solución concentrada 10x.

-Solución de vitaminas*.

Para 1 litro (solución concentrada 100x):

Tiamina.....50 mg

Biotina.....10 mg

Ácido nicotínico.....100 mg

Pantotenato de calcio.....200 mg

Piridoxina-HCl.....50 mg

Riboflavina.....100 mg

Ác. p-aminobenzoico (PABA).....100 mg

Inositol.....24.000 mg

* Esta solución se esterilizó mediante filtración y se guardó a 4°C protegida de la luz.

-Suplementos:

Se prepararon en agua a en una solución concentrada 100x, excepto para la biotina que fue de 10.000x.

Biotina: 100mg/l. Esterilizada por filtración.

Ácido p-aminobenzoico (PABA): 100mg/l. Autoclave, 20 minutos a 110°C.

Pantotenato de calcio: 200mg/l. Esterilizado por filtración.

Piridoxina-HCl (Vitamina B6): 5g/l. Esterilizada por filtración.

Inositol: 1,2g/l. Esterilizado por filtración.

3.1.2 Ensayos de resistencia/sensibilidad a cationes.

En los experimentos de resistencia a la posible toxicidad de distintos cationes se utilizaron diferentes concentraciones de los cationes de interés, siendo añadidos al medio de cultivo como sales de cloro. A continuación se encuentra una lista con las concentraciones finales (cf) utilizadas para cada compuesto:

KCl	cf=1 M
KCl	cf=10 mM
KCl	cf=100 mM
LiCl	cf=0,3 M
KH ₂ PO ₄	cf=1 M
CsCl	cf=0,3 M
NaCl	cf=1 M
NaCl	cf=100 mM
MgSO ₄	cf=200 µM
MgSO ₄	cf=1 mM
NaH ₂ PO ₄	cf=200 µM
NaH ₂ PO ₄	cf=1 mM
FeCl ₂	cf=5 mM
FeCl ₃	cf=5 mM
MgCl ₂	cf=0,2M
CaCl ₂	cf=0,1 M
Na ₂ MoO ₄	cf=25 mM

3.1.3 Otras soluciones utilizadasTampón de protoplastos

MgSO₄..... 1,2M
NaH₂PO₄..... 10mM, pH 5,8

Colchón de flotación

D-Sorbitol..... 0,6M
Tris-HCl..... 0,1M, pH 7,5

Solución ST

D-Sorbitol..... 1M
Tris-HCl..... 10mM, pH 7,5

Solución STC

D-Sorbitol..... 1M
Tris-HCl..... 10mM
CaCl₂..... 10mM, pH 7,5

Solución PEG

PEG 6000.....10mM
Tris-HCl..... 10mM
CaCl₂..... 10mM, pH 7,5

Tampón de extracción de proteínas NP40

EDTA.....1mM
KCl.....20mM
NP40.....0,1mM
DTT..... 0,5mM

1 pastilla de inhibidores de proteasas de Roche por 50mL de tampón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tampón de carga de geles SDS (TGCS)

Tris-HCl.....0,06M. pH6,8
Dodecil sulfato sódico (SDS).....0,007M
B-mercaptoetanol.....0,06M
Urea.....6M
Azul de bromofenol..... $7,5 \times 10^{-5}$ M

Tampón de lisis de protoplastos

Sorbitol.....200mM
Acetato potásico.....50mM
Hepes.....20mM pH7,2
EDTA.....2mM

“Cocktail” inhibidor de proteasas (Roche)

Solución de extracción de DNA

Tris HCl..... 25mM pH=8
Sacarosa.....250mM
EDTA.....20mM

Solución Fenol/SEVAG

Para preparar 50mL de esta solución utilizamos:

Fenol.....25mL
Cloroformo.....24mL
Alcohol isoamílico.....1mL

Tampón 2xSSC

NaCl.....3M
Citrato sódico.....0,3M

Tampón CHURCH (para 100mL)

BSA.....1g

EDTA.....200 μ L

SDS 20%.....35mL

H₂O.....15mL

Na₂HPO₄.....30mL

NaH₂PO₄.....20mL

Ajustar a pH 7 con hidróxido sódico si es preciso.

H₂O-DEPC

2 litros H₂O

2mL DEPC

Agitar previamente durante 12 horas a temperatura ambiente y posteriormente autoclavar a 121°C durante 30 minutos.

MOPS

33,49g MOPs..... cf = 0,4M

3,28g AcNa (o 5,43g si es x 3H₂O)..... cf = 0,1M

0,75g EDTA.....cf = 0,01M

H₂O-DEPC hasta 400mL

Ajustar a pH 7,2 y esterilizar en autoclave a 121°C durante 30 min

3.2. CEPAS DE *Aspergillus*, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

UTILIZADOS.

3.2.1 Cepas de *Aspergillus nidulans*.

Las cepas utilizadas en esta tesis doctoral se enumeran en la Tabla M1. Todas las estirpes portan la mutación *veA1* de pérdida de función en VeA (Velvet), que causa la conidiación profusa en ausencia de luz [100]. Los marcadores se describen en [101].

Nombre	Características	Origen
MAD782	<i>pygG89, yA2, pabaA1</i>	Dr.Herb Arst
MAD997	<i>pantoB100, PacC^C700, PacC^{+/-}70001</i>	Dr.Herb Arst
MAD1065	<i>MoR19, PacC^C700, PacC^{+/-}70001, pantoB100</i>	Dr.Herb Arst
MAD1066	<i>MoR21, PacC^C700, PacC^{+/-}70001, pantoB100</i>	Dr.Herb Arst
MAD1067	<i>MoR24, PacC^C700, PacC^{+/-}70001, pantoB100</i>	Dr.Herb Arst
MAD1123	<i>pabaA1, pyrG89, MoR24, sltA</i>	Dr.Herb Arst
MAD1124	<i>MoR24, pabaA1, pyrG89</i>	Dr.Herb Arst
MAD1151	<i>yA2, adE20, phenA2, MoR24, pantoB100</i>	Dr.Herb Arst
MAD1400	<i>glrA, PacC^C700::GFP, pantoB100</i>	Dr.Herb Arst
MAD1440	<i>inoB2, glrA</i>	Dr.Herb Arst
MAD1739	<i>pyroA4, pyrG89, ΔnkuA::argB</i>	Dr.Herb Arst
MAD2471	<i>argB2((argB*-gpdA^P GFP(pHdomPLCδ1)₂) pabaA1, yA2</i>	Dr.Herb Arst
MAD2736	<i>yA2, pabaA1, ΔtrkB::pyrG^{AF}</i>	Dr.Herb Arst
MAD2922	<i>pyroA4, ckiA2, yA2</i>	Ane Markina
MAD3112	<i>biA1, yA2, pabaA1, pyrG89, ΔnkuA::argB, niiA4, halA24, sltA1</i>	Dr.Herb Arst
MAD3210	<i>pabaA1, trkB::GFP::pyrG89^{AF}, MoR24</i>	Ane Markina
MAD3231	<i>ΔhalA::pyr-4 (HF27c)</i>	Dr.Herb Arst
MAD3232	<i>inoB2, pyroA4, ΔtrkA::paba^{AF}, niiA4</i>	Dra.Helen Findon
MAD3233	<i>yA2, ΔhalA::pyr-4, ΔtrkA::paba^{AF}, niiA4</i>	Dra.Helen Findon
MAD3234	<i>halA::GFP::pyrG^{AF}, pyroA4, ΔnkuA::argB</i>	Esta tesis
MAD3235	<i>halA::(HA)₃::pyrG^{AF}, pyroA4, ΔnkuA::argB</i>	Esta tesis
MAD3236	<i>halA::GFP::pyrG^{AF}, hhoA::mch::pyroA^{AF}, ΔnkuA::argB</i>	Esta tesis
MAD3237	<i>pyroA4, ΔtrkC::pyrG^{AF}, ΔnkuA::argB</i>	Esta tesis
MAD3238	<i>trkB::(Myc)₃::pyrG^{AF}, pyroA4</i>	Esta tesis
MAD3239	<i>trkB::(Myc)₃::pyrG^{AF}, pabaA1, halA24</i>	Esta tesis
MAD3240	<i>trkB::GFP::pyrG^{AF}, wA4, inoB2, pyroA4, (Myc)₃-PacC(pacC900)</i>	Ane Markina
MAD3241	<i>MoR24, pabaA1, pyrG89, pAMA</i>	Esta tesis
MAD3242	<i>MoR24, pabaA1, pyrG89, pAMA-trkA</i>	Esta tesis
MAD3243	<i>MoR24, pabaA1, pyrG89, pAMA-halA</i>	Esta tesis
MAD3244	<i>pyroA4, pyrG89, ΔnkuA::argB, pAMA</i>	Esta tesis
MAD3245	<i>pyroA4, pyrG89, ΔnkuA::argB, pAMA-trkA</i>	Esta tesis
MAD3246	<i>pyroA4, pyrG89, ΔnkuA::argB, pAMA-halA</i>	Esta tesis

Tabla M1. Cepas de *Aspergillus nidulans* utilizadas en esta tesis doctoral.

3.2.2 Plásmidos utilizados en *Aspergillus nidulans*.

Los plásmidos indicados a continuación se utilizaron como moldes para obtener los DNAs codificantes para las distintas etiquetas con las que poder marcar fluorescentemente o con epítomos a las proteínas de interés. Estos fragmentos se obtuvieron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para cada gen, normalmente denominados GFP 1-2 + nombre del gen.

p1439: Plásmido utilizado para hacer el etiquetado carboxilo terminal con GFP de una proteína cualquiera. Es un vector TOPO en el que se ha clonado un conector de 5xglicina-alanina, seguido de GFP en fase y de un fragmento genómico en el que se encuentra el locus *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*. Este plásmido fue cedido por el Prof. S. Osmani (Ohio University, USA).

p1503: Plásmido construido para etiquetar proteínas en el extremo carboxilo terminal con el epítomo HA3x. Basado en los plásmidos de S. Osmani para realizar reemplazamientos génicos. Tiene las mismas regiones flanqueantes que p1439. Este plásmido fue obtenido por el Dr. E. Espeso (CIB-CSIC-Madrid).

p1827: Plásmido utilizado para hacer el etiquetado carboxilo terminal con CherryRed de una proteína cualquiera. Basado en los plásmidos del Prof. S. Osmani para realizar reemplazamientos génicos. Tiene las mismas regiones flanqueantes que p1439. Este plásmido fue cedido por la Dra. H. Findon (Imperial College, London).

p1874: Plásmido utilizado para hacer el etiquetado carboxilo terminal con Myc3x de una proteína cualquiera. Basado en los plásmidos de S. Osmani para realizar reemplazamientos génicos. Tiene las mismas regiones flanqueantes que p1439. Este plásmido fue obtenido por la Dra. A. Hervás (CIB-CSIC-Madrid).

3.2.3 Oligonucleótidos utilizados en esta tesis doctoral.

Los oligonucleótidos sintéticos se diseñaron con el programa informático Vector NTi 8 y fueron suministrados por Sigma. Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis se describen en la Tabla M2.

NOMBRE	SECUENCIA 5' - 3'	SECCIÓN
DHalA1	AGGCGGCCGCCATCGTCAATGCACAGCC	4.5
DHalA2	GGGGATCCGTGCGGTGAGTAGTAATGAAACAGG	4.5
DHalA3	GGGGATCCTATTCCCTTGCATTTTCAG	4.5
GSP1HalA	GCAACGTCACAGATCTCTAGC	4.7/4.8
GSP2HalA	GAAGCCTTCCTCACCCGC	4.7/4.8
GSP3HalA	TATTCCCTTGCATTTTCAGATAGC	4.7/4.8
GSP4HalA	ATGGCTAGATATGCTGCGAGTC	4.7/4.8
GFP1HalA	GCGGGTGAGGAAGGCTTCGGAGCTGGTGCAGGCGCTGG	4.7/4.8
GFP2HalA	GCTATCTGAAATGCAAGGGAATACTGTCTGAGAGGAGG CACTGATGC	4.7/4.8
SA1	CAGCCTTGCGCTGTAGGCT	4.4
SA2	CGTCCTTCATTGTGCGTTC	4.4
SA3B	CACCATCTGAAGAGTACCC	4.4
SA5	CTCATGGTTAAGTTGGACG	4.5
PP1TrkB	ATTCCACCACGGCGAGCTGCTGAATAAGG	4.9.3
PP2TrkB	CGGACCAGGACGAGAAGTGGTGTGGACTTG	4.9.3
GSP1TrkB	CGACCAATCTGAGCCTCG	4.9.6
GSP2TrkB	TCGCTGCGACTGTTGCG	4.9.6
GFP1TrkB	CGCAACAGTCGCAGCGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGC	4.9.6
GFP2TrkB	GTTGGAGTTGTGTGCGGCCTCGTGAGCGTAAGTCTGAGA GGAGGCACTGATGCG	4.9.6
GSP3TrkB	TTACGCTCACGAGGCCGACACAACCTCCAAC	4.9.6
GSP4TrkB	ACGCCTCCATTAGTCGCGAGAGGAGACAGA	4.9.6
SMP1TrkB	CAAGTCCACACCACTTCTCGTCCTGGTCCGACCGGTCGC CTCAAACAATGCTCT	4.9.3
GSP1H1	CTACAGTTGAGCCTATGCACAAG	4.8
GSP2H1	GGCCTTCTTGTCTTAGCAGTC	4.8
GFP1H1	GACTGCTAAGAACAAGAAGGCCGAGCTGGTGCAGGCG CTGGAGCC	4.8
GFP2H1	CCAAGCCAGGCTGCCTGTCTGTCTGAGAGGAGGCACTG ATGC	4.8
GSP3H1	ACAGGCAGCCTGGCTTGG	4.8
GSP4H1	GCAACAGTCGACAGCACAGC	4.8
PP1TrkC	CTGACGCTCTCTTCGATCGAACCC	4.9
PP2TrkC	CTTGGGCCTGGAATTGTTTGAGTTCTT	4.9.3
SMP1TrkC	AAGAACTCAAACAATTCCAGGCCCAAGACCGGTCGCCT CAAACAATGCTCTTCACC	4.9.3
GFP2TrkC	CCCTCCATGACCCGTGAGTGTTTCCGTCTGAGAGGAGGC ACTGATGCGTGATGCC	4.9.3
GSP3TrkC	GGAAACACTCACGGGTCATGGAGGG	4.9.3
GSP4TrkC	TTATTGGCATGGCAGTGAAGCGG	4.9.3
TrkCNorthUP	CCGATGCCTTGTTTATGTGCG	4.9.2
TrkCNorthD	CTCCACAGAATGACAGATCCC	4.9.2

Tabla M2: Oligonucleótidos utilizados en esta tesis doctoral.

3.2.4 Generación de casetes mediante PCRs de fusión.

Los fragmentos de DNA utilizados para generar las cepas mutantes con los alelos nulos o que expresen proteínas fusionadas a distintas etiquetas fueron obtenidos mediante PCRs de fusión según el protocolo descrito por Yang [13]. A continuación se detallan las diferentes construcciones realizadas junto con los oligonucleótidos utilizados en cada caso.

3.2.4.1 Construcciones utilizadas para la generación de alelos nulos.

La figura M1 es un esquema representativo del proceso seguido para generar los diferentes casetes de transformación. Un casete de transformación para generar un alelo nulo se compone de una región 5' no codificante, de aproximadamente 1 kb del gen diana y de una región 3' no codificante, del mismo tamaño (terminador) de dicho gen, fusionadas ambas al gen marcador de selección (se utilizó el gen *pyrG* de *A. fumigatus*). En los casetes para el etiquetado con epítomos o proteínas fluorescentes se substituye el fragmento 5'UTR por un fragmento genómico correspondiente a la región 3' de la secuencia codificante del gen diana, donde se ha eliminado el codón de parada. En todos los casos, cada fragmento de DNA fue amplificado por separado (figura M1) y después se realizó la fusión de los fragmentos. Para llevar a cabo estas amplificaciones se utilizó la polimerasa Prime Star® HS DNA polimerase (Takara). Las condiciones de PCR fueron las indicadas en la tabla M3, con ligeras variaciones en función de los oligonucleótidos empleados y el tamaño esperado del “amplicón”. Todas las construcciones se transformaron en la cepa MAD1739.

MATERIALES Y MÉTODOS

DNAs	0,5 µg de cada uno de ellos
Oligonucleótidos.....	0,5 µM de cada uno de ellos
Mezcla de dNTPs.....	200 µM
Tampón de la enzima.....	10µL
Enzima polimerasa.....	0,3µL (2,5 unidades/µL)
H ₂ O.....	hasta 50µL

Condiciones generales de los ciclos de PCR:

98°C	2min
98°C	10seg
55°C	5seg x10 ciclos
72°C	4min
98°C	10seg
58°C	5seg x15 ciclos
72°C	4min*
72°C	5min
4°C	mantenimiento

* +20sec de extensión en cada ciclo

TablaM3: Condiciones generales para generar fragmentos de fusión por PCR

- **$\Delta trkC$:** La región correspondiente al promotor de *trkC* se amplificó con los oligonucleótidos PP1trkC y PP2trkC, la región correspondiente al terminador de *trkC* se

amplifico con los oligonucleótidos GSP3trkC y GSP4trkC, y el gen *pyrG*^{Afum} se amplificó con los oligonucleótidos SMP1trkC y GFP2trkC, utilizando como molde el plásmido 1439. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, PP1trkC y GSP4trkC.

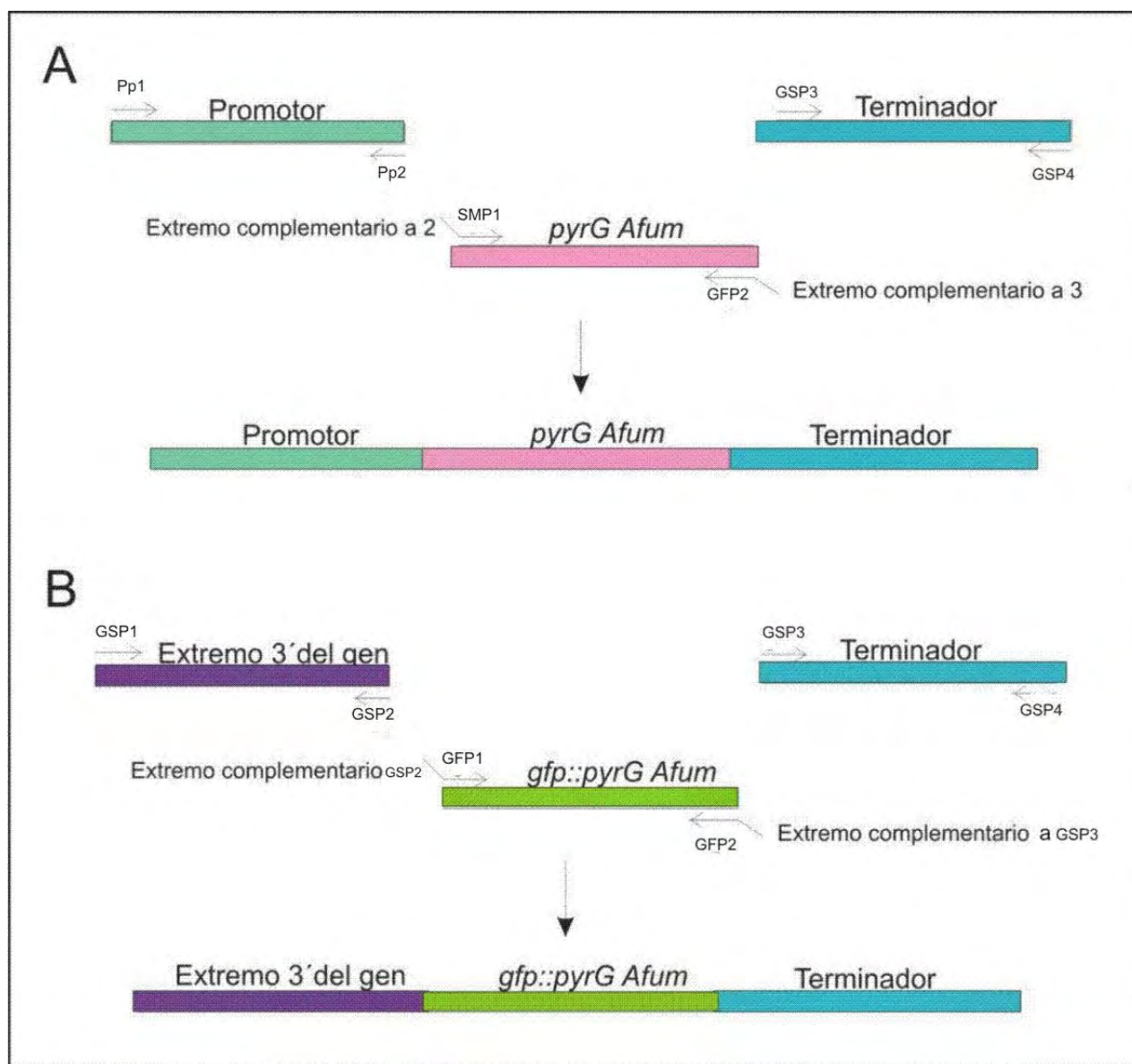


Figura M1: Estrategia para generar casetes de transformación mediante PCR de fusión. **A)** Casete para generar alelos nulos. **B)** Casete para generar formas etiquetadas. Cada uno de los fragmentos es amplificado por separado mediante PCR con una pareja de oligonucleótidos específicos (con las siglas GSP, GFP y SMP-1). El fragmento central, *pyrGAfum* o *gfp::pyrGAfum*, es amplificado con una pareja de oligonucleótidos que llevan una región complementaria a los fragmentos con los que se va a fusionar.

3.2.4.2 Construcciones utilizadas para la generación de cepas que expresan proteínas fusionadas diferentes etiquetas.

- **HalA::GFP:** La región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *halA* se amplificó con los oligonucleótidos GSP1HalA y GSP2HalA, la región correspondiente al terminador de *halA* se amplifico con los oligonucleótidos GSP3HalA y GSP4HalA, y el fragmento *gfp::pyrG^{Afum}* se amplificó con los oligonucleótidos GFP1HalA y GFP2HalA, utilizando como molde el plásmido 1439. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos que aparean en las posiciones más extremas de los fragmentos flanqueantes, GSP1HalA y GSP4HalA.

- **HalA::3xHA:** La región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *halA* se amplificó con los oligonucleótidos GSP1HalA y GSP2HalA, la región correspondiente al terminador de *halA* se amplificó con los oligonucleótidos GSP3HalA y GSP4HalA, y el fragmento *3xHA::pyrG^{Afum}* se amplificó con los oligonucleótidos GFP1HalA y GFP2HalA, utilizando como molde el plásmido 1503. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, GSP1HalA y GSP4HalA.

- **Histona HHO::CH:** La región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *hhoA* (AN2765), codificante de la histona H1 se amplificó con los oligonucleótidos GSP1H1 y GSP2H1, la región correspondiente al terminador de *hhoA* se amplifico con los oligonucleótidos GSP3H1 y GSP4H1, y el fragmento *cherry::pyroA4* se amplificó con los oligonucleótidos GFP1H1 y GFP2H1 utilizando como molde el plásmido 1827. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, GSP1H1 y GSP4H1.

- **TrkB::3xMyc:** La región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *trkB* se amplificó con los oligonucleótidos GSP1trkB y GSP2trkB, la región correspondiente al terminador de *trkB* se amplifico con los oligonucleótidos GSP3trkB y GSP4trkB, y el fragmento *3xmyc:: pyrG^{Afum}* se amplificó con los oligonucleótidos GFP1trkB y GFP2trkB, utilizando como molde el plásmido 1874. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, GSP1trkB y GSP4trkB.

3.3. TÉCNICAS DE *Aspergillus nidulans*.

3.3.1 Mantenimiento y cultivo de estirpes.

El medio MCA sólido (véase Materiales y Métodos, apartado 3.1.1.2), con los requerimientos necesarios, se utilizó para el mantenimiento vegetativo de las cepas y la obtención de conidiosporas.

3.3.2 Transformación de *A. nidulans*.

La transformación se realizó siguiendo el protocolo descrito por Tilburn y colaboradores [102]. Se inocularon 2×10^6 conidiosporas en 400mL de medio mínimo que contenían como fuente de nitrógeno tartrato amónico 5mM y D-glucosa al 1% como principal fuente de carbono, añadiendo los requerimientos apropiados para cada cepa. El cultivo se incubó durante 16-18 h a 30°C y el micelio se recolectó por filtración y se lavó con agua destilada estéril. Se resuspendió 1g de micelio en 20mL de tampón de protoplastos frío y estéril. El tratamiento para destruir la pared celular se realizó con la mezcla de enzimas Vinoflow® (Novozymes) a la concentración de 150mg de

Vinoflow por cada gramo de micelio. La mezcla de digestión se incubó durante 5 minutos en hielo y posteriormente a 30°C durante 1 a 2 h con agitación suave. A partir de los 90 minutos de digestión la formación de protoplastos se comprobó con un microscopio en diferentes momentos. Para purificar los protoplastos se depositó la suspensión en dos tubos estériles de 50mL y se cubrió, sin mezclar, con un volumen igual de la solución estéril colchón de flotación enfriada a 0°C. Los tubos con la solución bifásica se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 4000g en el rotor basculante A-4-44 (Eppendorf 5810R). Los protoplastos, que forman una banda en la interfase, se recogieron con una pipeta Pasteur estéril. A partir de este punto se realizaron diferentes lavados de los protoplastos, diluyéndolos inicialmente con 2 volúmenes de solución ST y centrifugando posteriormente a 2800g durante 10 minutos a 4°C en el rotor A-4-44. Se eliminó el sobrenadante por decantación y se lavó el sedimento de protoplastos con 1mL de solución ST, resuspendiéndolos y centrifugándolos nuevamente a 5.000 r.p.m., repitiendo este proceso tres veces. Después de estos lavados, se determinó la concentración de protoplastos ajustándola a 5×10^8 protoplastos/mL mediante concentración o dilución con solución STC. En un tubo de 50mL estéril se mezclaron cuidadosamente 200 µl de esta suspensión con 1 a 3 µg DNA añadiéndose a continuación 50µl de la solución de PEG. La mezcla de transformación se incubó 20 minutos en hielo y a continuación se añadió 1mL de solución PEG mezclando enérgicamente e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos adicionales.

Finalmente se añadieron 5mL de solución STC a cada tubo, se mezcló suavemente y se añadieron 15mL de “Top agar” fundido y atemperado a 48°C a cada tubo, mezclándose las dos soluciones mediante inversión y repartiendo 5mL de la

mezcla por la superficie de cada placa de medio de regeneración con los requerimientos adecuados.

3.3.3 Análisis fenotípicos mediante crecimiento en medio sólido.

Estos análisis se realizaron sobre MMA sólido (ver apartado 3.1.1.1 de esta sección) con agar (Oxoid), suplementos adecuados. Los resultados se evaluaron tras 1-2 días de crecimiento a 37°C.

3.3.4 Cruces entre estirpes de *Aspergillus*

Para favorecer la anastomosis entre hifas de dos estirpes parentales distintas, los cruces se realizaron mediante inóculos puntuales de ambas estirpes en una misma placa de MCA suplementado con los requerimientos de las dos cepas. Los parentales tenían distintos requerimientos nutricionales e, idealmente, distintos marcadores de color de las esporas para facilitar la identificación de los cleistotecios híbridos una vez observada la progenie. Una vez favorecida la anastomosis, 2-3 días de crecimiento a 37 °C, se recortaron pequeñas porciones de medio sólido en las zonas donde habían entrado en contacto las hifas de ambos parentales. Estas porciones se traspasaron a placas de MMA selectivo, que permite sólo el crecimiento de los heterocariontes, suplementado con glucosa al 1% como fuente de carbono y tartrato amónico 5 mM y nitrato sódico 10 mM como fuentes de nitrógeno.

Las placas se incubaron a 37 °C hasta que se formaron sectores heterocarióticos. Para favorecer la entrada en ciclo sexual, las placas de MMA con los sectores heterocarióticos se sellaron con cinta de celo con la finalidad de inducir estrés por

anaerobiosis. Los cleistotecios se formaron a lo largo de los 10-15 días de incubación a 37 °C. Estos se recogieron de la placa con una aguja estéril utilizando una lupa. Los cleistotecios se limpiaron de las células de Hülle que poseen adheridas a su superficie rodándolos sobre agar al 1,5% solidificado. Posteriormente, cada cleistotecio se introdujo en un tubo de 1,5mL con 100 µl de agua estéril y se rompió contra las paredes del tubo para liberar las ascosporas. Para comprobar si el cleistotecio era híbrido se inocularon 5 µl de esta solución de ascosporas sobre una placa de MMA selectivo para ambas cepas parentales en busca de progenie recombinante. Las placas se analizaron tras cultivarlas dos días a 37 °C. Los cleistotecios que no procedían de un evento de cruzamiento sexual entre las dos cepas parentales fueron descartados.

3.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR, BIOQUÍMICA Y PROTEÓMICA.

3.4.1 Extracción de proteínas totales de *A. nidulans*.

Los extractos proteicos totales de las distintas cepas de *A. nidulans* se obtuvieron a partir de 200-250mg de micelio húmedo. El micelio de las diferentes cepas fue filtrado con un filtro Miracloth (Calbiochem 475855), congelado en nieve carbónica y liofilizado durante 18h en un liofilizador Cryodos (Telstar). El micelio liofilizado, depositado en un tubo de tapón de rosca de 2mL se trituró con una bola de cerámica de 0,55 cm utilizando un molino (FP120 Fast Prep Cell Disruptor de BIO101/Savant) con un pulso de 10 segundos a fuerza 4,0. A continuación se añadió 1 mL de tampón de extracción de proteínas NP40, se resuspendió el polvo de micelio y se incubó durante 1,5 horas a 4°C con agitación por inversión utilizando una rueda giratoria. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 14.000g y 4°C, se recogió el sobrenadante y se

midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford [103]. Los extractos proteicos se guardaron a -80°C hasta su utilización.

Para los ensayos de “Western-blot” se precipitaron 50µg de proteína con ácido tricloroacético (TCA), concentración final 10% (v/v), y se lavaron con 1mL de la mezcla Etanol/Éter 1:1 y con 1mL de la mezcla 1:3 sucesivamente. Una vez precipitadas se resuspendieron en 40µL de tampón de carga de geles de poliacrilamida/SDS y se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C durante 5 minutos.

3.4.2 Ensayos de inmunodetección de proteínas, “Western Blot”.

Las muestras precipitadas se resuspendieron en 40 µl de tampón de carga de geles de SDS y se desnaturalizaron hirviéndolas a 100°C durante 5 minutos. La separación electroforética se realizó en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida [104].

El protocolo de “Western Blot” utilizado fue el descrito por Orejas y colaboradores [46]. Las proteínas etiquetadas se detectaron, según el caso, con los anticuerpos primarios detallados en la tabla 3. Se utilizó el anticuerpo secundario adecuado a la especie en la que se generó el anticuerpo primario. En todos los casos los anticuerpos secundarios utilizados estaban conjugados a la peroxidasa de rábano (Tabla 3). La actividad peroxidasa se detectó utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham). Las imágenes se obtuvieron mediante un analizador de imágenes de quimioluminiscencia 06-LAS3000Q (TDI) y se analizaron con el programa Multi Gauge V3.0 (Fujifilm).

ANTICUERPOS		DILUCIÓN	FUENTE	REFERENCIA
Primarios	α - GFP	1:5000	ratón	Clones 7,1 y 13,1, Roche
	α - actina	1:50000	ratón	Clon C4, ICN Biomedicals Inc.
	α - cMyc	1:1000	ratón	9E10, Santa Cruz Biotechnology
	α - HA	1:10000	rata	3F10 Roche
	α - mRFP	1:4000	conejo	R1310 Pab Rbx USBiological
	α - Hexoquin.	1:80000	conejo	AB1807 Chemicon Intemat.,Inc.
Secundarios <i>conjugados a peroxidasa</i>	α - mouse IgG	1:4000	cabra	115-035-003, Jackson ImmunoResearch Inc.
	α - rat IgM + G	1:4000	cabra	3010-05, Southern Biotech
	α - rabbit IgG	1:3000 1:10000	asno	NA934, Amersham Biosciences

Tabla M4: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta tesis doctoral. En la tabla se indica tanto la dilución del anticuerpo como la fuente y la referencia del mismo.

3.4.3 Fraccionamiento celular.

Los primeros pasos son comunes con el proceso de obtención de protoplastos para transformación, aun así se repiten aquí para describir el protocolo completo. Las soluciones también son las mismas y están descritas anteriormente.

Se inocularon 2×10^6 esporas en 400 mL de medio mínimo con fuentes de carbono y nitrógeno así como con los suplementos necesarios en un matraz de 2L (ver sección 3.3.2). El cultivo se incubó durante 16h a 30°C con agitación orbital. Se recogió el micelio usando un filtro miracloth estéril y se lavó con agua estéril, secándose

posteriormente. A continuación se resuspendió 1 g de micelio en 20 mL de solución TP y se añadió 150 mg/g de enzima Vinoflow. La mezcla se agitó vigorosamente utilizando un “vortex” y se incubó 5 minutos a 0°C. El micelio se depositó en un matraz de 100mL y se incubó a 30°C en agitación suave hasta la obtención de protoplastos, aproximadamente 90 minutos adicionales. La suspensión de protoplastos se dispuso en tubos adecuados para una posterior centrifugación y se añadió el mismo volumen de solución colchón lentamente si mezclar. La solución bifásica se centrifugó a 4000 r.c.f durante 10 minutos a 4°C. Se recogió el halo de protoplastos localizados en la interfase formada, se depositaron en un tubo adecuado y se añadió 2 volúmenes de solución ST mezclando por inversión. Los protoplastos fueron recolectados centrifugando a 2800 r.c.f durante 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1mL de solución STC.

A partir de este punto se desarrolla el protocolo específico de fraccionamiento celular. Se añadió 1mL de tampón de lisis de protoplastos frío y los protoplastos se lisaron utilizando un “Dounce” mediante 20 pasos enérgicos del émbolo. Del mililitro de lisado se separó 50µL que fueron mezclados con 80 µL de tampón de carga de geles de SDS, denominándose a esta mezcla como extracto total, indicada como ET en los experimentos. El resto de lisado se centrifugó a 300g durante 5 minutos a 4°C. Se separó el sobrenadante del sedimento y a este último se resuspendió en 100µL de tampón de carga de geles de SDS. De esta forma se obtuvo la fracción correspondiente a las membranas y a los grandes agregados celulares, denominada como P0,3k. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 13.000g durante 15 minutos a 4°C. Al sedimento obtenido se resuspendió en 400µL de tampón de lisis de protoplastos y 40µL de TCA y se precipitaron las proteínas siguiendo el protocolo descrito en el apartado

MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. En este extracto proteico se encuentran proteínas procedentes de membranas y del interior de los distintos orgánulos, y se le denominó P13k.

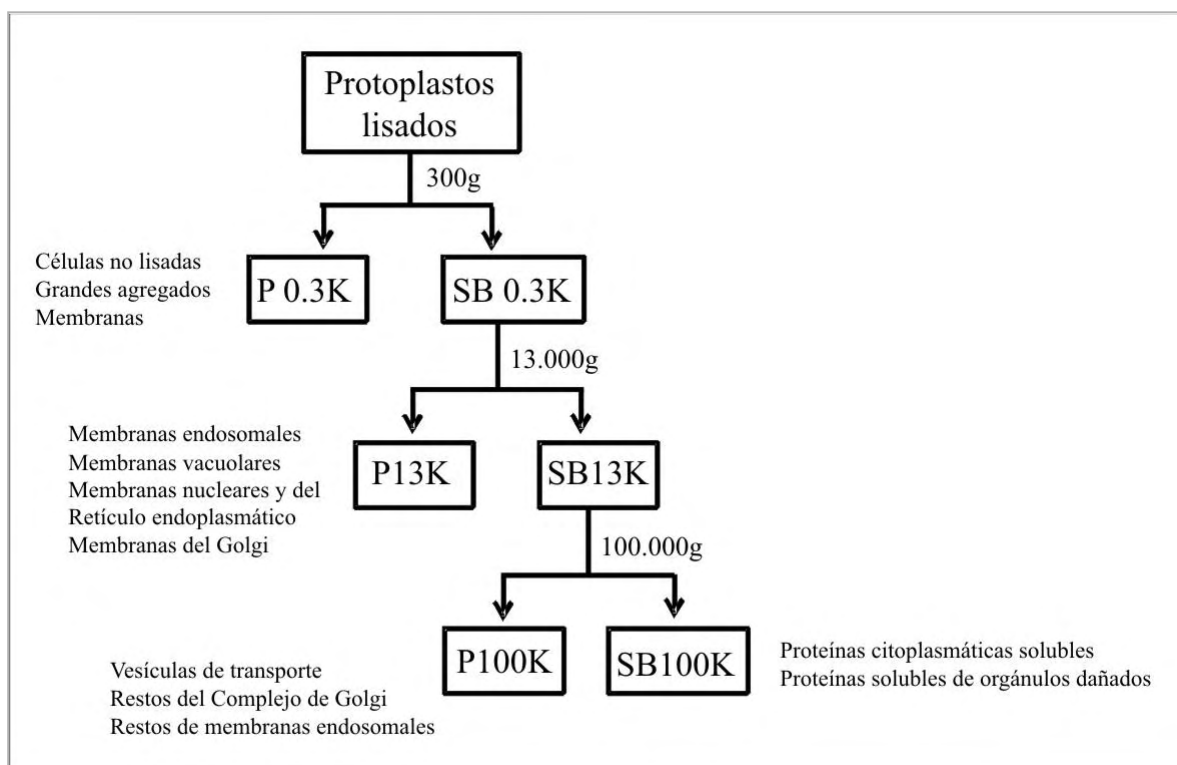


Figura M2: Representación de los pasos a seguir en un fraccionamiento celular. Tras cada centrifugación se van obteniendo las distintas fracciones celulares indicadas en la figura.

El sobrenadante de la centrifugación anterior se pasó a un tubo de policarbonato indicado para un rotor de ángulo fijo TLA-100.2. El nuevo paso de sedimentación se realizó centrifugando a 100.000g durante 1 hora y 5 minutos a 4°C usando una ultracentrífuga Beckman TL100. El sobrenadante fue recogido y las proteínas presentes se precipitaron utilizando el protocolo de precipitación con TCA. De esta forma se obtuvo la fracción correspondiente a las proteínas solubles citoplasmáticas, identificada como SB100k. El sedimento obtenido se resuspendió en 400µL de tampón de lisis de

protoplastos y las proteínas se precipitaron con TCA. En esta fracción se encuentran, principalmente, vesículas de transporte y restos de membranas endosomales y del complejo de Golgi. A esta fracción se la denominó P100K. La presencia de las proteínas de interés en cada una de las diferentes fracciones se caracterizó siempre mediante la técnica de “Western-blot” (ver apartado 3.4.2).

3.4.4 Extracción de DNA en *Aspergillus*.

El protocolo de aislamiento de DNA se inició con un cultivo en medio mínimo del hongo. Cada cepa se creció inoculando 20mL de MMA con 1mL de una solución de 2×10^6 conidiosporas en Tween 10^{-4} , e incubando a 37°C durante 16 hrs. El micelio se recogió con un filtro de miracloth, se eliminó el medio residual prensándolo y 200mg se liofilizaron en tubos de tapón de rosca de 2mL. El micelio liofilizado se pulverizó utilizando una bola de cerámica de 0,55cm y el molino FastPrep Cell Disruptor de BIO101/Savant con un pulso de 20 segundos y potencia 4,0 de agitación. El micelio pulverizado se resuspendió en 1mL de la solución de extracción de DNA. Una vez resuspendido se añadieron 100µl de SDS al 10%, para evitar la formación de excesiva espuma durante el proceso y a continuación se incubó 15 minutos a 65°C para liberar los ácidos nucleicos al medio. El lisado obtenido se trasvasó a otro tubo para realizar una extracción fenólica de proteínas y restos celulares adicionando 1mL de la solución denominada Fenol/SEVAG e incubándolo durante 15 minutos con fuerte agitación a temperatura ambiente. Tras esta incubación se centrifugaron las muestras 5 minutos a temperatura ambiente a máxima velocidad. Posteriormente se recogió la fase superior y se transvasó a otro tubo donde se repitió el proceso de fenolización añadiendo 1mL de la solución fenol/SEVAG e incubando nuevamente durante 15 minutos con agitación

fuerte a temperatura ambiente. Después de la segunda fenolización se adicionaron 3M acetato sódico (pH= 6) en una proporción 1/10 y 0,6 volúmenes de isopropanol respecto al volumen recogido previamente para precipitar los ácidos nucleicos presentes en la muestra. Tras una incubación de 15 minutos se centrifugó la muestra y se lavó el pellet por inversión con 1mL de etanol a 80%. A continuación se procedió a eliminar el RNA presente en la muestra. Para ello se resuspendieron los ácidos nucleicos en 300-500µl de agua Milli-Q y 1 µl/100µl de RNAsa (libre de DNAsa) 5mg/mL y se incubó a 37°C durante 1 hora. Como último paso se añadieron acetato sódico 3M (pH= 6) en una proporción 1/10 y 0,6 volúmenes de isopropanol para recoger el DNA precipitado. Este DNA se lavó con 500µl de etanol al 80% para ser resuspendido finalmente en 200µl de agua Milli-Q.

3.4.5 Análisis de DNA por el método de Southern.

Una vez aislado el DNA de las cepas a analizar (siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.4.3) se digirió el DNA con una enzima de restricción que permitía diferenciar unas cepas de otras por los diferentes tamaños de bandas obtenidos (ver detallado el apartado de resultados) y con el tampón correspondiente a esa enzima completando el volumen final con agua hasta 40µl. Esta digestión se llevó a cabo a 37°C durante aproximadamente 16 horas. El producto de la digestión se corrió en un gel de agarosa al 0,8% con una diferencia de potencial de 90-110 voltios. El gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL) durante 15 minutos, se fotografió y después se rompió el DNA con una exposición de 10 minutos en un transiluminador de UV (BioRad GelDoc System). Tras este proceso el gel se incubó con solución desnaturalizante (NaCl 1,5M, NaOH 0,5M) durante 45 minutos a temperatura ambiente

y en agitación. Después se lavó con agua y se incubó con solución neutralizante (TrisHCl 0,5M pH7,5, NaCl 3M) durante 40 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Tras esta segunda incubación se lavó el gel con tampón 2xSSC y se preparó una transferencia del DNA a una membrana de Nylon. Una vez que el DNA se había transferido a la membrana, aproximadamente 16 horas, se fijó el DNA a la membrana exponiendo ésta 5 minutos a luz UV utilizando un transiluminador (Biorad modelo GelDoc). A continuación la membrana se hidrató en 2xSSC y se incubó en 50 mL de tampón “Church” (ver apartado 3.1.3) durante 2 horas a 55° C en un horno de hibridación Red Roller II (Pharma Biotech). Transcurridas esas 2 horas se retiró el tampón Church y se añadió 50mL de solución Church fresca que contenía la sonda marcada radiactivamente la cuál había sido previamente desnaturalizada a 95°C durante 10 minutos. La membrana se incubó con la sonda radioactiva durante aproximadamente 16 horas a 55°C. Finalmente se lavó el filtro durante 15 minutos a 55°C con 60mL de 2xSSC/0,1 % SDS y posteriormente con 60 mL de 0,2xSSC/0,1 % SDS. Para visualizar las bandas de hibridación se utilizó un sistema de análisis de imágenes Phosphorimager Fujifilm FLA-3000.

3.4.6 Análisis del RNA por el método de Northern Blot.

Se recogieron 10^6 conidiosporas en Tween 10^{-4} y se inocularon en el medio necesario durante toda la noche a 30°C en agitación. Para todo el proceso de extracción del RNA total se recomienda siempre realizar todo el proceso refrigerado con hielo para evitar la degradación del RNA.

Se recogió el micelio en condiciones estériles mediante filtración a través de miracloth, se eliminó el medio sobrante y se el hongo se congeló con nitrógeno líquido durante, al menos, 10 minutos. En caso de no utilizarse inmediatamente, las muestras así congeladas se guardaron a -80°C. En un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido se trituró el micelio congelado y se transfirieron aproximadamente 300mg de micelio a un tubo de 2mL. A cada tubo se le añadió 1mL de solución TriReagent (Fluka-Sigma) siendo posteriormente incubados los tubos 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0,2mL de cloroformo y se incubó durante tres minutos a temperatura ambiente. A continuación se procedió a centrifugar los tubos durante 15 minutos a 12000g a una temperatura de 4°C y se transfirió la fase acuosa otros tubos nuevos. A continuación se añadieron 0,75mL de solución TriReagent (Fluka-Sigma) y se incubaron los tubos 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0,2mL de cloroformo y se incubó durante tres minutos a temperatura ambiente. A continuación se procedió a centrifugar los tubos durante 15 minutos a 12.000g a una temperatura de 4°C y se transfirió la fase acuosa otros tubos nuevos. A esta segunda fase acuosa se le añadieron 0,5mL de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, mezclando periódicamente los tubos por inversión. Finalmente, se centrifugaron los tubos a 12.000g, durante 10 minutos a 4°C, tras los cuales, precipitó el RNA. Como último paso en la extracción, se eliminó el sobrenadante por vacío y se añadió 1mL de una solución de etanol en agua al 75% la cual está tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma). Tras mezclar y disolver el pellet de RNA, se centrifugaron las muestras a 7.500g, durante 5 minutos, a 4°C. Se volvió a eliminar el pellet con vacío y se redisolvieron las muestras en 20-200µL de agua tratada con DEPC (libre de RNAsa). Se incubó a 55-60°C para ayudar a disolver el pellet. Rápidamente se congelaron los tubos en nitrógeno líquido y posteriormente se guardan a -80°C.

Las muestras se prepararon añadiendo a cada muestra, 12,5µL formamida (MERCK), 2,5µL 10xMOPs, 4µL formalina (formaldehído al 33%), 10µL RNA. Se desnaturalizaron las muestras durante 10 minutos a 65°C. A continuación se corrieron las muestras de RNA en un gel de agarosa al 0,8% con H₂O-DEPC, 10mL 10xMOPS y 18mL de formalina a 30V. El gel se tiñó durante 15 minutos con bromuro de etidio y se lavó con H₂O destilada. A continuación se preparó la transferencia del gel a una membrana de nylon y se siguieron los mismos pasos para generar la sonda, hibridación, lavados y visualización de las bandas de hibridación que los descritos en el protocolo de Southern Blot (apartado 3.4.5).

3.5. Microscopía de fluorescencia y análisis de las imágenes.

Las muestras se observaron mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon 80i, equipado con objetivos de 60 x y 100 x aumentos con 1,4 de apertura numérica, una lámpara de mercurio de 100 W, un filtro GFP-3035B (Semrock Brighthline) para la detección de la fluorescencia emitida por GFP y un filtro TXRED-4040B (Semrock Brighthline) para la detección de la fluorescencia emitida por mRFP, CherryFP o FM4-64. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital ORCA-ER (Hamamatsu Photonics) y se utilizaron los programas de obtención y tratamiento de imágenes Wasabi (Hamamatsu Photonics) y Metamorph (Molecular Devices).

Para la observación de las muestras se inocularon 10µl de la solución de conidiesporas sobre la superficie de un cubre-objetos de vidrio redondo de 14mm de diámetro o cuadrado de 20x20mm (Menzel-Glaser), sumergido en 3mL de WMM, con D-glucosa 1% (p/v), tartrato amónico 5mM y los requerimientos necesarios, con objeto de evitar la precipitación de las sales de fosfato presentes en los elementos traza y su

interferencia en la observación al microscopio (véase Materiales y Métodos, apartado 3.1.1.1) suplementada, de no indicarse lo contrario, con 25 mM NaH₂PO₄, quedando así ajustado el pH del medio en un valor próximo a 5,2. Los cubreobjetos se colocaron en placas de 12 ó 6 pocillos (Falcon) y se incubaron a temperatura ambiente (25°C) durante aproximadamente 18 horas. Las células crecieron sobre la superficie del cubreobjetos quedándose fijadas a éste por la capacidad de adherencia de las células del hongo y, para su observación, el exceso de medio del cubreobjetos se escurrió sobre una servilleta y se dispuso éste sobre un portaobjetos para la observación directa al microscopio del hongo.

3.6 KITS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA Y OTROS COMPONENTES COMERCIALES UTILIZADOS EN ESTA TESIS.

3.6.1 Kits de Biología molecular y Bioquímica.

Los ensayos realizados con los “kits” que a continuación se detallan fueron llevados a cabo siguiendo las instrucciones de los fabricantes, con mínimas modificaciones.

FastDNA® Kit BIO101® Systems (Q-BIOgene): se utilizó para la extracción de DNA genómico de *A. nidulans*.

QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen): se utilizó para la purificación de productos de PCR.

QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen): se utilizó para la purificación de fragmentos de DNA procedentes de electroforesis en geles de agarosa.

Rediprime™ II Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences): se utilizó para el marcaje de fragmentos de DNA con dCTP [^{32}P] que fueron posteriormente utilizados como sondas en ensayos de Southern-Blot.

ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (Amersham Biosciences): se utilizó para la limpieza de las sondas marcadas radiactivamente con el kit anterior.

ECL™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences): se utilizó para la detección de anticuerpos conjugados a la peroxidasa de rábano en ensayos de Western Blot.

3.6.2 Productos radioactivos.

En las hibridaciones DNA-DNA se empleó [α - ^{32}P]-dCTP con una actividad específica de 3000Ci/mmol (“Amersham Biosciences Redivue Deoxycytidine 5'-triphosphate, [α - ^{32}P]”).

3.6.3 Reactivos y Enzimas de biología molecular.

Los reactivos químicos utilizados y los suplementos de los medios de cultivo fueron de calidad analítica, generalmente de las marcas Sigma, Fluka y Merck. Los componentes de origen microbiológico de los medios de cultivo utilizados fueron suministrados por Oxoid, Difco Laboratories o Pronadisa. Las enzimas de restricción utilizadas procedían de New England Biolabs, Roche o Takara. Los reactivos empleados en las reacciones de PCR fueron suministrados por Takara (Prime Star® HS DNA polimerase).

3.7. Herramientas Bioinformáticas.

Para la búsqueda de secuencias tanto genómicas como proteicas se usaron las bases de datos de *A. nidulans*, *S. cerevisiae* y *S. pombe*, Instituto Broad de Cambridge, Base de datos SGD e Instituto Sanger de Cambridge respectivamente. Los análisis de secuencias, tanto de nucleótidos como de aminoácidos, se realizaron mediante software de libre acceso. Las búsquedas en bases de datos se realizaron con el algoritmo BLAST [105]. Los alineamientos múltiples fueron realizados con el programa ClustalX [106] y el programa Genedoc facilitado por el Sistema de Recursos de Supercomputación Biomédica de Pittsburgh y corregidos manualmente. Para la realización de los árboles filogenéticos se utilizó el programa Mega 4. Para la realización y análisis de las distintas construcciones utilizadas en esta tesis se empleó el programa Vector NTI (Invitrogen). Finalmente para el modelado de proteínas se utilizó el programa Swiss-Model y la predicción de dominios transmembrana se realizó usando el programa TMHMM versión 2.0 facilitado por el Centro para Análisis de Secuencias Biológicas de la Universidad de Dinamarca. Para el análisis de los sitios de fosforilación se utilizó el programa informático NetPhos 2.0.

Direcciones web utilizadas:

Base de datos de *A. nidulans*: www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus

Base de datos de *S. cerevisiae*: www.yeastgenome.org

Base de datos de *S. pombe*: www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe

Genedoc: www.nrbsc.org/gfx/genedoc

Mega4: www.megasoftware.net

Swiss-Model: <http://swissmodel.expasy.org>

RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1 SELECCIÓN DE SUPRESORES DEL FENOTIPO DE SENSIBILIDAD AL MOLIBDATO CAUSADO POR LA MUTACIÓN $\text{pacC}^{+/-}$ 70001

Uno de los fenotipos que exhiben las cepas con mutaciones de pérdida de función tanto en PacC como en los componentes de la ruta de señalización Pal es la sensibilidad a determinadas concentraciones del anión molibdato, MoO_4^{2-} . La cepa mutante $\text{pacC}^{+/-}70001$ no es una excepción y de hecho es muy sensible a partir de una concentración de 10-20mM del anión molibdato en el medio de cultivo (25mM MoO_4^{2-} mostrado en figura R1 B).

Utilizando como herramienta el fenotipo sensibilidad al molibdato causado por la mutación $\text{pacC}^{+/-}70001$, se elaboró un sistema de selección de mutantes para la búsqueda de supresores extra- o intragénicos (esquematizado en figura R1 A). El objetivo principal fue el aislamiento de mutaciones que suprimieran específicamente la localización citoplásmica de la proteína mutante PacC70001 dando lugar a su acumulación nuclear y, por lo tanto, de nuevo un fenotipo de ganancia de función para PacC, dado que la proteína mutante PacC70001 es capaz de unir al DNA y así mediar su función transcripcional [96]. Se pronosticaron dos clases mayoritarias de mutantes, en primer lugar aquellos que portarían mutaciones en *cis*, entre las que se encontrarían aquellas que afectarían al residuo mutagenizado previamente (reversión intragénica) o en otras regiones de PacC5-250. En segundo lugar mutantes en *trans*.

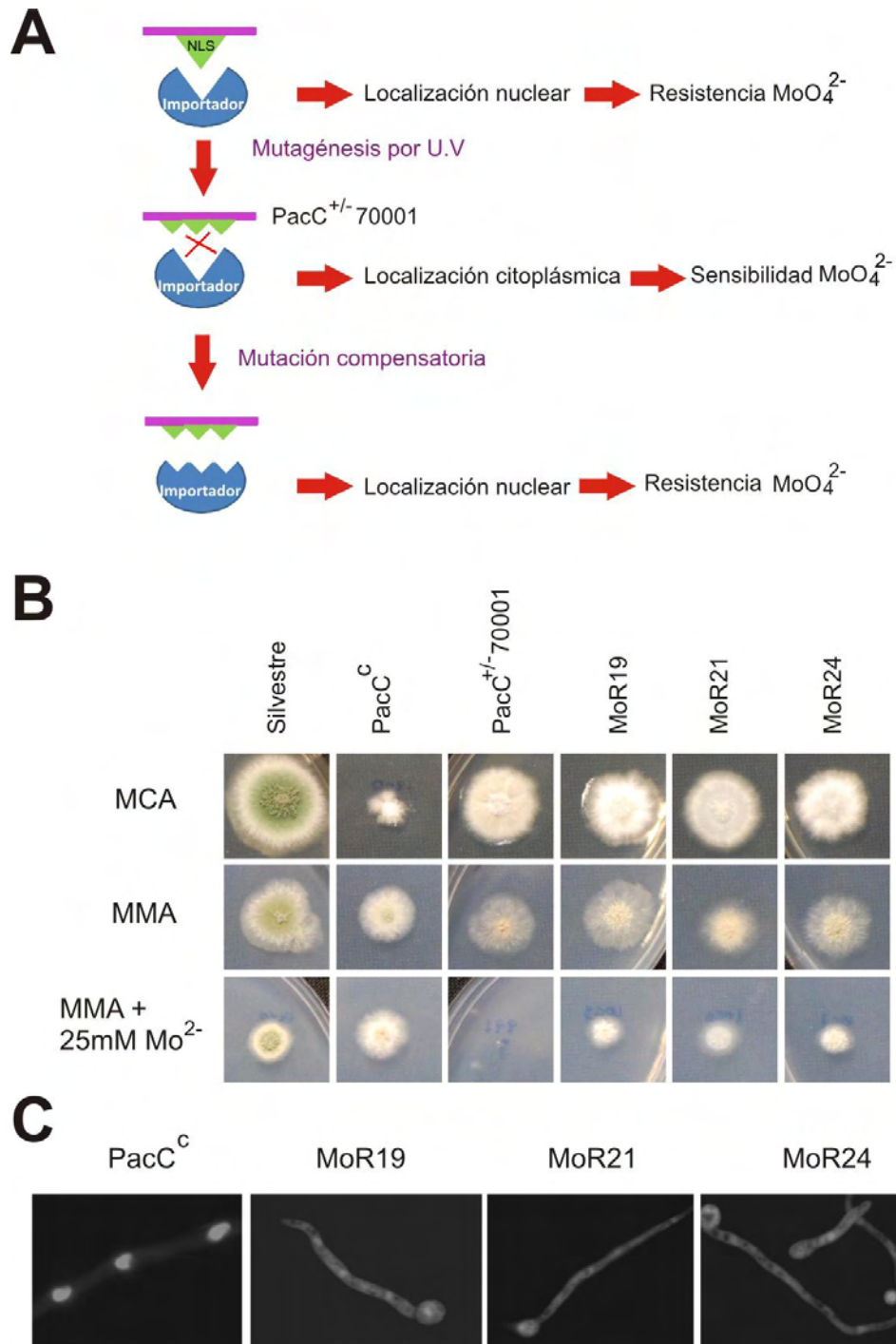


Figura R1: A) Esquema del proceso de mutagénesis y selección utilizado. B) Análisis del fenotipo de resistencia a una concentración de 25 mM de molibdato sódico por una cepa silvestre (MAD1440), una cepa que expresa de forma constitutiva PacC (MAD1400), una cepa con pérdida de función de PacC (MAD997) y los diferentes mutantes resistentes a molibdato obtenidos a partir de MAD997 (cepas MAD1065, MAD1066 y MAD1067). C) Localización celular de PacC en MAD1400 y en los diferentes mutantes MoR seleccionados. En la tabla M1, se detallan los fenotipos de las cepas indicadas en esta figura.

Entre estos últimos estarían mutantes en el posible importador nuclear de PacC cuyos cambios en su estructura primaria podrían promover el reconocimiento de la secuencia de localización nuclear (NLS) mutante en PacC70001 y así dar lugar a la recuperación de la acumulación nuclear de esta proteína.

El proceso de selección de mutantes supresores de la mutación K159M se llevó a cabo en el laboratorio del Profesor H. Arst. Para ello, se irradiaron con luz UV esporas de la cepa MAD997 que portaba la mutación K159M en PacC700 y se seleccionaron supresores en medio mínimo de *Aspergillus* suplementado con 25 mM de molibdato sódico. En este proceso se seleccionaron 17 cepas y se les designó con el nombre MoR (*Molybdate-Resistant*) y un número. De entre estos mutantes se seleccionaron 6 y se continuó su estudio mediante técnicas genéticas clásicas. Finalmente el trabajo se redujo a 3 mutantes, MoR19, MoR21, y MoR24. Como se observa en la figura R1 B las cepas que portan cada uno de estas mutaciones muestran diferentes grados de resistencia al ion molibdato.

La secuenciación del locus *pacC* permitió determinar rápidamente que las tres mutaciones supresoras son extragénicas a PacC y posteriormente se comprobó que tampoco alteraban a ninguno de los diferentes genes pertenecientes a la ruta Pal. Así mismo, se determinó que las mutaciones MoR no afectaban a la localización citoplásmica de PacC^{+/-}70001 (figura R1 C), por lo tanto se concluyó que eran mutantes en el sistema de detoxificación de molibdato, del cual se desconocía su base molecular. Sin embargo, es pertinente indicar que en la actualidad poco se ha avanzado en este aspecto.

RESULTADOS

Para proceder a la caracterización de las mutaciones MoR se determinó en el laboratorio del Prof. Arst (Imperial Collage, Londres), la localización cromosómica utilizando para ello el ciclo parasexual de hongo y cepas que portaban mutaciones en cada uno de los ocho cromosomas de *A. nidulans*. En la figura R2 se muestra de forma esquemática el posicionamiento de MoR24 y MoR19 en el brazo derecho del cromosoma III y a MoR21 en el brazo derecho del cromosoma IV. El gen *pacC* se localiza en el cromosoma VI y como se menciona anteriormente, ya se evidenció por la secuenciación del *locus* *pacC*, que los mutantes MoR son mutaciones extragénicas a este gen.

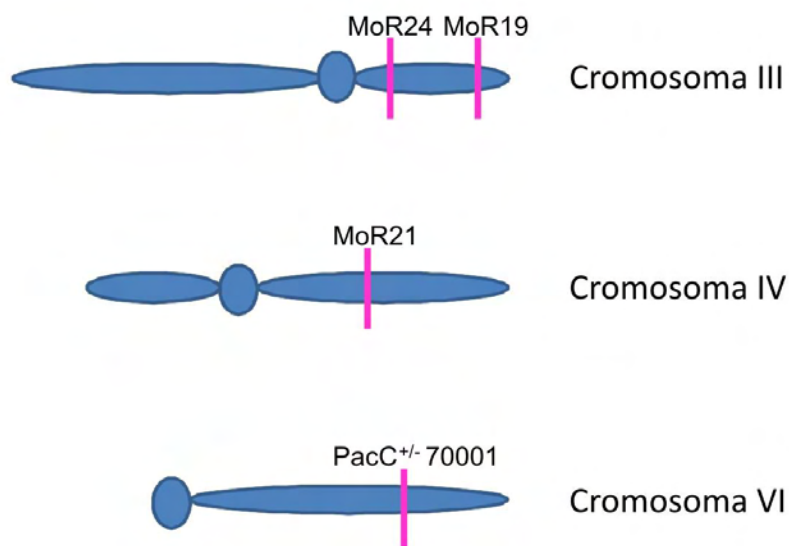


Figura R2: Localización de las mutaciones MoR analizadas en el genoma de *Aspergillus nidulans*.

Debido al excepcional fenotipo mostrado por la cepa mutante MoR24 se determinó seguir adelante con su caracterización lo que ha permitido profundizar en el mecanismo de respuesta a estrés catiónico en *Aspergillus nidulans*.

4.2 MUTANTE MoR24

De entre todos los mutantes seleccionados en molibdato destacaba el número 24, MoR24, que siendo una mutación extragénica a *PacC*, presentaba además otros fenotipos de diferente sensibilidad a cationes y mostraba afectada su morfología colonial en el fondo genético *pacC^{+/-}70001*. Ninguno de los otros mutantes presentaba un fenotipo similar al de MoR24.

Trabajos anteriores del grupo demuestran que las cepas *pacC⁻* crecen muy bien en medios ajustados a valores de pH ácido (pH 4-5) [47], de hecho es la técnica habitualmente utilizada para el mantenimiento y propagación de cepas con pérdida de función en el sistema de regulación por pH ambiental. Para conseguir estas condiciones de acidificación del medio se añade NaH_2PO_4 (figura R3) o KH_2PO_4 (datos no mostrados) a la concentración final de 1 M para cada compuesto en el medio de cultivo MCA. Como se observa en la (Figura R3), la cepa MoR24 *pacC^{+/-}70001* presentaba una notable inhibición del crecimiento en medio completo tamponado a valores de pH ácidos (incubación a 37°C durante 48 horas).

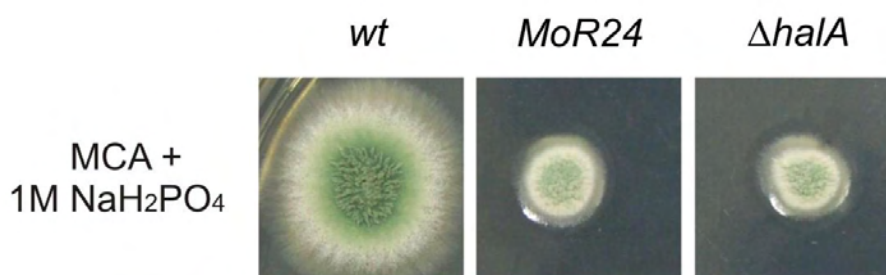


Figura R3: Crecimiento de una cepa silvestre y del mutante MoR24 en MCA con fosfato sódico. El fenotipo observado se debe exclusivamente a la ausencia de un *HalA* funcional y no a *PacC^{+/-}* ya que la cepa *ΔhalA* posee un *PacC* funcional. Nota: la cepa *ΔhalA* no se cita en esta parte del texto, ver más adelante en sección 4.4.

RESULTADOS

La resistencia al ion molibdato, y la incapacidad del mutante MoR24 para crecer normalmente a pH ácido, nos hizo hipotetizar que se había encontrado una nueva clase de mutantes en el sistema de regulación por pH ambiental. MoR24, podría tratarse de un mutante extremo de mimesis de crecimiento en alcalinidad “mutantes-alcalinos”, pero en este caso careciendo de un PacC funcional. Por lo tanto se decidió continuar con el estudio del mutante MoR24 para comprobar la anterior hipótesis o verificar si estaba afectado un circuito regulador alternativo al de pH ambiental.

4.3 ANALISIS GENÉTICO DEL MUTANTE MoR24.

El libre acceso y posterior publicación de la secuenciación del genoma de *A. nidulans* [7], ofreció una nueva y potente herramienta para la búsqueda y rápida identificación de genes de interés. En el caso de la identificación del locus donde se localizaba la mutación MoR24 ofreció la posibilidad de realizar un trabajo adicional sobre la relación o conversión entre distancias genéticas y moleculares [107]. Para este trabajo se contó de nuevo con la inestimable colaboración del Prof. H. N. Arst del Imperial Collage que fue quien realizó el análisis genético.

Usando técnicas genéticas clásicas mediante la utilización de los ciclos de reproductivos parasexual y sexual del hongo [108], se procedió al “mapeo” de la mutación MoR24, utilizando para ello, entre otros fenotipos asociados, la resistencia al molibdato de estas cepas. Mediante el ciclo de vida parasexual, donde existe intercambio genético entre dos cepas sin existir recombinación entre cromosomas, o con una muy baja probabilidad debido a sobrecruzamientos mitóticos, se realizó el estudio para la localización cromosómica de MoR24. Para ello se usaron cepas denominadas “master strains” que contenían un marcador fácilmente seleccionable en cada uno de los [76]

ocho cromosomas del hongo. De esta forma se localizó MoR24 en el brazo derecho del cromosoma III.

Una vez localizada la posición de la mutación MoR24 en el cromosoma III se trató de delimitar entre qué genes se encontraba esta mutación. Utilizando cepas que contenían diferentes mutaciones en el cromosoma III y mediante el ciclo reproductivo sexual del hongo se pudo verificar que la mutación MoR24 se encontraba entre los genes *phenA* y *cbxA* del brazo derecho del cromosoma III (figura R4).

4.4 IDENTIFICACION DE MoR24, AN8830.

Una vez localizada la región en la que se encontraba la mutación se procedió a la identificación del gen que contenía la mutación MoR24. Se abordaron dos técnicas diferentes para la identificación del gen:

Técnica 1: Complementación del fenotipo del doble mutante MoR24, *sltA1*.

Para la identificación de MoR24 se utilizó un primer abordaje experimental consistente en la complementación del fenotipo del doble mutante *MoR24, sltA1*. SltA es un factor de transcripción implicado en la homeostasis de cationes [94]. Una cepa nula para este factor de transcripción presenta una elevada sensibilidad frente a una gran variedad de cationes y frente a un pH alcalino (pH=8). Una cepa doble mutante pérdida de función para *sltA*, alelo *sltA1*, y MoR24 muestra un requerimiento de elevadas concentraciones de calcio en el medio, fenotipo que se ha denominado posteriormente como “auxotrofía de calcio” [50]. Para identificar el *locus* en el que se localiza MoR24 se trató de complementar ese doble mutante utilizando una genoteca de DNA genómico (DNA-g) construida en el plásmido autorreplicativo pRG3-AMA-NotI.

RESULTADOS

Se realizaron experimentos de transformación utilizando diferentes cantidades de la genoteca de DNA-g y una cepa *pyrG89*, *MoR24*, *sltA1* (MAD3112). Se seleccionaron transformantes que portaban plásmidos autorreplicativos utilizando el marcador *pyrG89*, dado que el plásmido tiene el gen homólogo en *Neurospora crassa* *pyr-4*, y que fuesen capaces de crecer en bajas concentraciones de calcio. De los diferentes transformantes se aisló DNA genómico, que contiene también DNA plasmídico, y con una fracción de este aislado se transformó *E. coli* seleccionando los diferentes clones mediante la resistencia al antibiótico β -lactámico ampicilina que confiere el plásmido. Se obtuvieron plásmidos con insertos de DNA-g de diferentes tamaños y se procedió a determinar los límites del inserto en cada uno de los aislados mediante secuenciación del mismo utilizando oligonucleótidos que apareaban en las regiones flanqueantes al sitio de multiclonaje. Se determinó que la mayoría de los plásmidos contenían, en mayor o menor medida, la región genómica del locus *sltA*. A destacar que uno plásmidos recuperados contenía la región genómica del locus *trkA* que codifica para un homólogo de los transportadores de potasio, TRKs, de *Saccharomyces cerevisiae* (este plásmido se ha utilizado posteriormente en este estudio).

Los diferentes plásmidos se transformaron por separado en la cepa doble mutante *MoR24*, *sltA1* para verificar que complementaban el fenotipo de “auxotrofia de calcio”. Todos los plásmidos que contenían el gen *sltA* silvestre complementaban dicho fenotipo, sin embargo el plásmido aislado con el gen *trkA* no complementó al doble mutante *MoR24*, *sltA1*. Ya que en nuevos intentos se obtuvieron mayoritariamente plásmidos que contenían al gen *sltA*, determinados mediante PCRs diagnóstico, se abandonó este abordaje experimental.

Técnica 2: Amplificación y secuenciación de loci candidatos.

Dado que el análisis genético limitaba la posición de MoR24 entre *phenA* y *cbxA* en primer lugar se procedió a identificar a dichos *loci* y posteriormente considerar cuales serían los posibles candidatos dentro de esa región del cromosoma III. Se utiliza la nomenclatura de *locus* actual, versión 4 de la base de datos.

phenA, se identificó a este gen como el *locus* AN11135 que codifica para la *phenol* hidratasa, enzima perteneciente al metabolismo de la fenilalanina. Se caracterizaron varios mutantes clásicos en este locus [107] y se determinaron los cambios que causaban cada mutación, los cuales se indican en la tabla R1. Este locus se localiza entre AN8852 y AN8853 y fue anotado en la base de datos posteriormente a su publicación [107], por lo que posee un número de identificación no correlativo a los anteriores. El locus AN11135/*phenA* marcaba por lo tanto el límite “inferior” más próximo al centrómero respecto a *MoR24* y *cbxA* el límite “superior”.

cbxA(carC) se asoció al *locus* AN8739. Se identificó mediante gen candidato dado que la predicción de la base de datos lo identificaba como una subunidad de la succinato deshidrogenasa (ubiquinona). Mutaciones en diferentes subunidades confieren, en esta enzima mitocondrial, resistencia a carboxina (Pestanal), un pesticida con acción antifúngica utilizado para prevenir plagas. Hasta este estudio no se había caracterizado una mutación en esta subunidad que generase resistencia a este compuesto. Hay que reseñar que estas subunidades se han utilizado como marcadores de selección en transformación en diferentes hongos [109]. Las mutaciones identificadas se muestran en la tabla R1.

Entre los *loci* AN11135 y AN8739, los límites del análisis genético, se extienden ~190 kb, entre los cuales se debe encontrar el locus en que se localiza MoR24 (figura

RESULTADOS

R4). Para determinar dicho locus se amplificó la región genómica que contenía los siguientes *loci* utilizando para ello dos oligonucleótidos localizados respectivamente en la región 5' y 3' UTR de cada gen.

GEN	NOMBRE	ALELO	CAMBIO DE NUCLEOTIDO	CAMBIO DE AMINOÁCIDO	PROTEÍNA MUTANTE
<i>phenA</i>	Sin Anotar	phenA2	A100G	IVS1 ^a	1-18 + 15
		phenA4	A100G	IVS1 ^a	1-18 + 15
		phenA5	859insTT	F268fs ^b	1-267 + 19
		phenA7	G29A	G10D	G10D
		phenA8	G412A	W121 ^c	1-120
<i>halA</i>	AN8830.2	halA24	1566insATCAACTCGTCC	InsINSS	1-503 + INSS + 504-524
<i>cbxA/carC</i>	AN8739.2	cbxA17	A684G	H156R	H156R
		carC9	T483C	L89P	L89P
<i>suaB</i>	Gln-tRNA	suaB111	G145,904A	-	-
<i>hisA</i>	AN7430.2	hisA10	T973C	L296S	L296S
<i>gdhB</i>	AN7451.2	gdhB1	ΔT1014-T1023	M318fs	1-317 + 12
<i>meaA</i>	AN7463.2	meaA8	C855T	Q231 ^c	1-230

Tabla R1: Mutaciones en cambios de secuencia estudiadas. ^a Alteración en la secuencia del intrón, ^b Marco de lectura, ^c Codón “stop”.

Los fragmentos amplificados por PCR se secuenciaron utilizando diferentes oligonucleótidos que cubrían la región codificante pronosticada en la base de datos. Se verificó la secuencia de cada *loci* en fragmentos amplificados mediante PCR que habían utilizado como molde DNA-g procedentes de cepas silvestre y mutante MoR24.

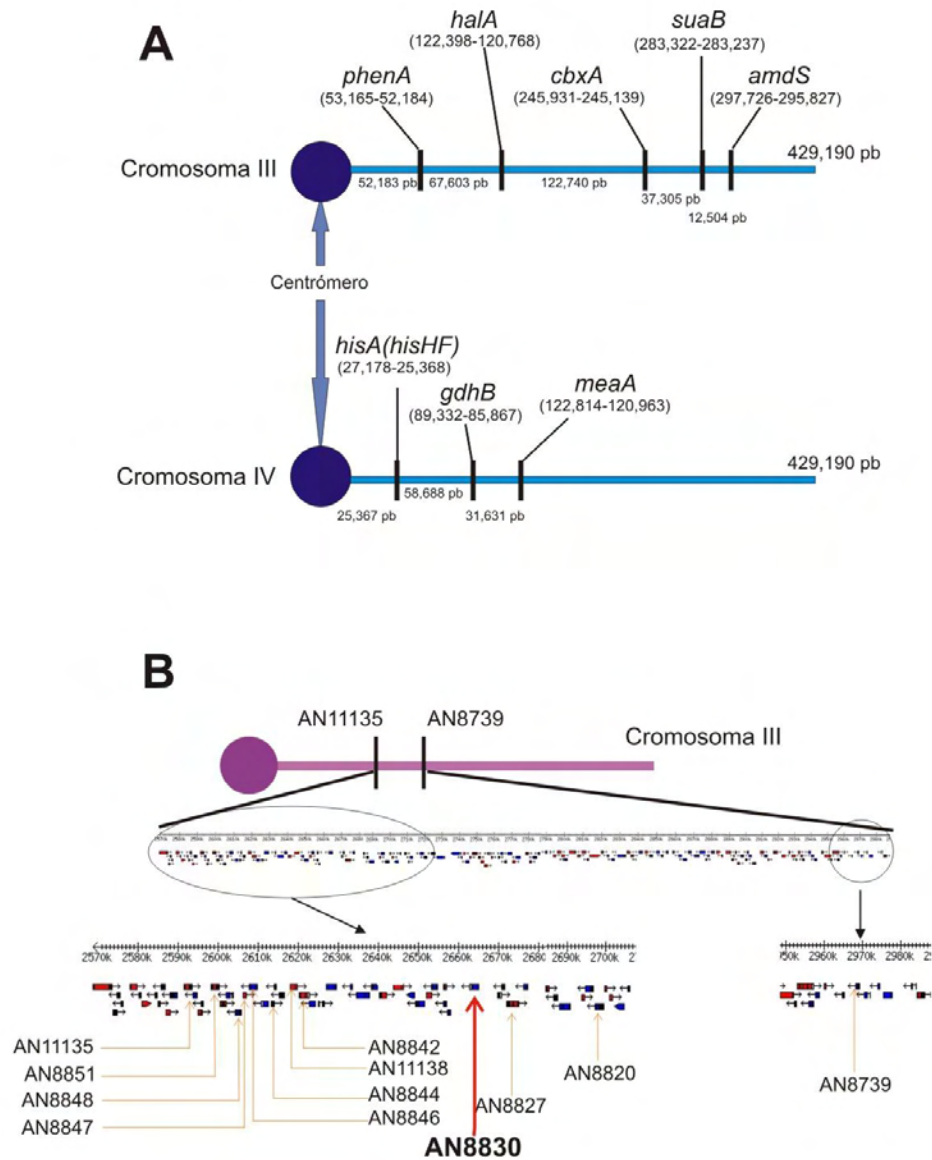


Figura R4: A) Distancias moleculares entre los *loci* de nuestro interés. B) Mapa genético de la región situada entre los loci AN11135 y AN8739 del brazo derecho del cromosoma III. Se indica mediante flechas los loci analizados.

Dado el fenotipo del doble mutante *MoR24*, *sltA1*, se atendió primero a verificar las secuencias de los genes cuyos productos podrían estar relacionados con la homeostasis del calcio:

RESULTADOS

AN8842, es el posible homólogo de *S. cerevisiae* Mid1p, MidA, que actualmente se está caracterizando en mayor detalle en el laboratorio. El gen *midA* codifica para una de las unidades que junto al homólogo de Cch1p en *A. nidulans*, denominado CchA y que es codificado por *AN1168*, han de componer un canal de calcio activado por potencial de membrana (calcium gated channel). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la secuencia de este locus en la cepa mutante MoR24 respecto a la base de datos. El análisis posterior en el laboratorio ha permitido determinar que cepas nulas *cchA* o *midA* no muestran un fenotipo de “auxotrofia de calcio” (Marquina y Espeso, sin publicar).

AN8820, *cnaA*, gen que codifica la subunidad catalítica de la calcineurina, la fosfatasa que señala diferentes rutas de forma calcio dependiente. No se encontraron diferencias respecto a la base de datos.

AN8827, *cmkC*, codificante para una quinasa C dependiente de calcio/calmodulina. En este locus si se observaron diferencias entre la secuencia publicada [110], la secuencia esta actualmente corregida en la base de datos.

Una vez verificada las secuencias de los candidatos más relacionados con la homeostasis de calcio, se abordaron a continuación aquellos genes que podrían participar en diferentes procesos de transporte de iones o de señalización. En los restantes *loci* secuenciados no se encontraron cambios respecto a la información descrita en la base de datos.

AN11138, situado entre los *loci* *AN8842* y *AN8843*, codifica para una proteína similar a ALR1p y ALR2p de *S. cerevisiae* los cuales participan en la homeostasis o resistencia al aluminio.

AN8844, gen sin caracterizar posible homólogo de *S. cerevisiae* HRT1, con un papel en el catabolismo de proteínas ubiquitina dependiente. En el momento de realizar la caracterización de MoR24 este *locus* estaba clasificado como codificante de una proteína involucrada en estrés por “hiper-osmosis”.

AN8846, gen sin caracterizar similar a Sm1p de *S. cerevisiae*, *gs-1* en *N. crassa*, codificante para una posible 1,3- β -glucansintasa.

AN8847 gen sin caracterizar con similitud a *PLP1* de *S. cerevisiae*, que codifica para una proteína similar a una Phosduccina.

AN8848, *gmtA* que codifica para un posible transportador de GDP-Manosa. Mutantes en el homólogo de este gen en *S. cerevisiae*, *VRG4*, dan lugar a resistencia a vanadato.

AN8851, *swoC*, que codifica para una pseudouridilato sintasa y participa en el establecimiento de la polaridad en las células vegetativas del hongo.

El análisis mediante candidatos finalizó con la caracterización del *locus* AN8830, anotado como un gen codificante para una proteína señalizadora involucrada en estrés salino que causaba halotolerancia.

En el *locus* AN8830 se identificó un cambio en la secuencia nucleotídica en el DNA genómico aislado de dos cepas independientes MoR24, respecto a otras dos cepas silvestre utilizadas como control. El cambio de nucleótidos que se observó en este caso fue la inserción de ATCAACTCGTCC en la posición 1566.

Para verificar que este cambio era el causante del fenotipo MoR24 se realizó un experimento de complementación con el *locus* AN8830. Para ello se amplificó el *locus* AN8830 (incluyendo regiones 5' y 3'UTR) con los oligonucleótidos SA4 y SA5

RESULTADOS

utilizando como molde DNA-g de las cepas silvestre y *MoR24*, cepa MAD1151 (*phenA2 MoR24*). Cada fragmento se introdujo en plásmidos autoreplicativos y se transformó con ellos a la cepa MAD1123 (*pabaA1, pyrG89, MoR24, sltA1*) y se verificó si complementaba el fenotipo de auxotrofía de calcio manteniendo el plásmido en cada transformante mediante crecimiento en medio selectivo para el marcador *pyrG89*. Los transformantes que portaban el plásmido con el gen *AN8830* silvestre crecieron en condiciones limitantes de calcio mientras que los transformantes con el plásmido con el gen *AN8830* procedente de la cepa *MoR24* siguieron mostrando el fenotipo del doble mutante *MoR24, sltA1* de igual forma que los transformantes que contenían el plásmido autorreplicativo vacío. Estos experimentos demostraban que *AN8830* era el gen donde se localizaba la mutación *MoR24*.

Para documentar mejor la relación desigual existente entre la frecuencia de recombinación y la distancia física en el intervalo *phenA-cbxA*, se analizaron 329 descendientes al azar del cruce *biA1; phenA2; cbxA17 x MoR24; inoB2; fwA1* (ver Clutterbuck [101], para los símbolos de los genes). De este análisis obtenemos una distancia de $1,8 \pm 0,7\text{cM}$ entre *phenA2* y *MoR24* y $13,5 \pm 1,7\text{cM}$ entre *MoR24* y *cbxA17*, una diferencia de 7,5 veces. Las distancias físicas son 67.765bp y 124.414bp respectivamente, una diferencia de 1,84 veces. Entre *phenA2* y *MoR24* 1cM corresponde a 37,6 kb y entre *MoR24* y *cbxA17* 1cM corresponde a 9,2 kb (figura R5). Para descartar que este fenómeno se debiera a una reorganización de los loci no descrito previamente en el cromosoma III, se analizó mediante PCR y Southern blot correcta organización de la región comprendida entre *phenA* y *cbxA* no habiéndose encontrado diferencias respecto al mapa genómico y la organización génica en la base de datos.

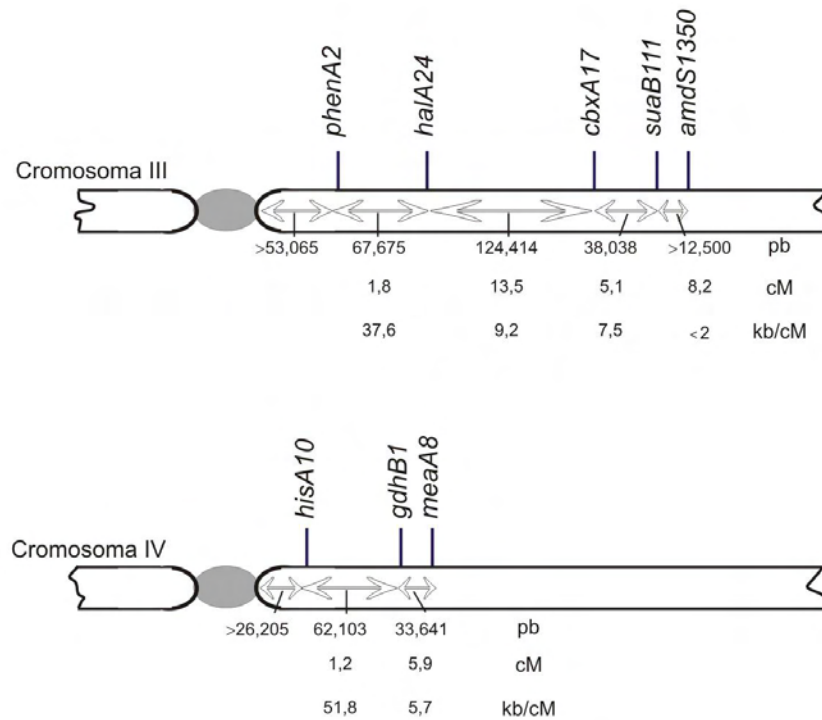


Figura R5: Frecuencias de recombinación y distancias genéticas entre las diferentes mutaciones utilizadas en el cromosoma III de *A. nidulans*. Frecuencias de recombinación de los marcadores según su posición respecto al centrómero.

La explicación más plausible para esta relación no lineal entre la frecuencia de recombinación y la distancia física era la proximidad del centrómero. En el año 1930 se describió por primera vez este fenómeno en *Drosophila melanogaster*, en donde se observó una reducción de la recombinación en las proximidades del centrómero [111]. Con nuestros resultados conseguimos determinar que en la cercanía del centrómero 1cM corresponde a aproximadamente 50 kb mientras que esta relación se reduce a menos de 2 kb por cada cM a una distancia de 240 kb de los centrómeros [112].

De esta forma conseguimos identificar el locus donde se localizaba la mutación MoR24, el gen AN8830 como se detalla más extensamente en la siguiente sección.

Caracterización del *locus* AN8830, *halA*.

Para verificar experimentalmente la estructura primaria de la proteína codificada por el *locus* AN8830, se procedió a la caracterización del cDNA de este *locus*. Se obtuvo una genoteca de cDNA mono hebra a partir de la reacción de la transcriptasa inversa y oligo-dT sobre RNA total purificado de una cepa silvestre. Posteriormente se amplificó de forma específica el cDNA de AN8830, usando el sistema 2 de la polimerasa Expand (Roche) y los oligonucleótidos SA1 y SA2. El fragmento de aproximadamente 1,9 kb se introdujo en el vector pCR-TOPO y se seleccionaron los plásmidos recombinantes. La secuencia nucleotídica del cDNA se determinó en dos plásmidos recombinantes utilizando los oligonucleótidos SA1, SA2 y SA3B. La secuenciación de ambos cDNAs mostró que la secuencia en la base de datos era correcta, así como la predicción de la metionina inicial, y confirmó la presencia de un intrón de 56 pb canónico (con extremos –GT y AG- a ambos lados del intrón y del tamaño previsible en *Aspergillus*) en la secuencia codificante. A partir de estos datos se dedujo la secuencia aminoacídica de AN8830 que, como se indicaba anteriormente, corroboraba la predicción automática de la base de datos.

La región codificante de AN8830 posee 2.490 nucleótidos y codifica para un polipéptido de 524 aminoácidos. Con la secuencia deducida de aminoácidos realizamos una búsqueda Blastp (Blast proteína-proteína) en la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes de la aplicación informática de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A

```

AN8830 : MT---PPGVSTIPSCV--SAPNSCISS--DHGRGVTCIAGMIS--ALNGDAALHSHVHPFC---IMANRISRMTC---GGRSTF---KPEESREIISSSSECCG : 93
Hal14  : MTGNNNNNAPIFCTRRKHA--SSKVMQLFRS--SRSSFCGRSSSLQPPS--INTNVESASRSARFGLPIPTTATIRVSNPSNTA--VERPEMYPYK--SASISHSSSSASL : 111
          MT      IP Q      A 3S 6      G R      Q A N6      N 1 6P      K K      T      R 6 3      G S P      E      S      S SSS

AN8830 : P-----TNGSGRQSTIPSSRSS--PAPSRQSTSTKVDHSENEENETDRKAF-----ACKDQKEGSTVQTRREILDLN--SHHHLKSTRRQPKLTLLRDMLG : 190
Hal14  : NHHIDIPSPSSASISLTSVSLSLSETSAINISSKSLSPFSSHSA--SNATTPATTTASNNVNNITNTS--ATTCGRSTVHRLCTHSHHLKNNRRQKRLSTMIKMMVG : 222
          T S      TS S      S      S3K 6      N T      F      K      6 R 6 D 3H HHLK 4RQERL3 664IM6G

AN8830 : GRKEDDDEEQQLSLMLSTWIDQES--KSNKNPETLPAGYMRQVVMCDKYFEGATFSGALNCFERCIYRS--QKDSRNN--HNITTPKRCPCQCFEYKGRCCQEVLGKARCVVRI : 256
Hal14  : KSKLRGSRKSAVDPIDMDPRITTSKSNKNPETLPAGYMRQVVMCDKYFEGATFSGALNCFERCIYRS--QKDSRNN--HNITTPKRCPCQCFEYKGRCCQEVLGKARCVVRI : 333
          K      A      66      KS      ERD      D R      N T      KYG4CQE66G4GAPG6VRI

AN8830 : KK---VDPPF--SKSEFLYAVKEFRRTTCE--TKYCKRLTSEFCISSSRH--NIHTLLDLDQAKGYCEVMEYCAGDLYTLVLAAGKLEVEADCFKQLMRGVYMHMG : 364
Hal14  : QRRNVSSQCKKSEFLYAVKEFRRTTCE--TKYCKRLTSEFCISSSRH--NIHTLLDLDQAKGYCEVMEYCAGDLYTLVLAAGKLEVEADCFKQLMRGVYMHMG : 444
          K V D KSE LYAVKEF4RR E3 KY KRLTSEFCISSSL H N16 TLDL QDARG YCEVMEYCAGDLYTLV6AAGKLE EADC FRQL6RGV YMHMG

AN8830 : VHRDLKPENLLITHTGLKITDFGNC--ECFRMAWEREPHMTGLCGSPYIAPEEYVEREFDPRAVDIACGVIYAMMRTGRHLKARKEEELFYRRYLEGRKHEDGYRF : 475
Hal14  : VHRDLKPENLLITHTGLKITDFGNC--ECFRMAWEREPHMTGLCGSPYIAPEEYVEREFDPRAVDIACGVIYAMMRTGRHLKARKEEELFYRRYLEGRKHEDGYRF : 554
          V HRDLKPENLLIT G LKITDFGNC ECF4MAWER H63 GCGS PYIAPEEY6 EFDPR VDIWACGVIYAMMRTGR LW A K D FY YL GRK GY P

AN8830 : IETHLRARCNRNVVYSILDPEHRRINSSQILKSEWREIRLCQAGEEGE : 524
Hal14  : IESIRARCNRNVYSMLDEVEYRRINGEQILNSEWREIRLCCHNRALK : 603
          IE3L NARCNRNVYS6LDP P RRIN QIL SEW REIR C G
  
```

B

```

AN8830 : -----TGSTPKFESSRKLSSSSSGRPTTNGSGKSRPTSPSSSRKPSRAPS----- : 119
Hal15  : GVPNHSNRTSEKNS--STPRSPVNRKNGGCMNSATNNVNGRNRITYMGRNHBDS--SSSLPKFQETCKCILDGRFXYFENGHYHESLVLPIITNNKNVDSGDE : 327
          STP4 P      S1      NG3G      R S      S

AN8830 : -----RCSTREVPKSENRNERTDRKAFPAQRDQFEGSTVQTRREILDN--SHRHLKSTRRQ----- : 178
Hal15  : KDALASVNSGDDGENDSEANMKKCSVSESLSLFSSHLGNGCQQQQQQQENGCQILNRPATSIISQRFIKSQTLRSETSNLKNNGNDELNRNDEGRNIPQIVNPN : 436
          4Q S 6      K K1      E 62K F 16P      LK 3R

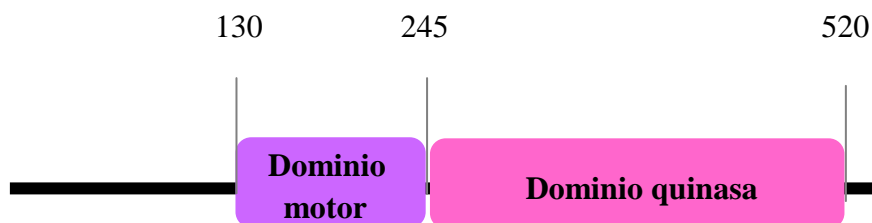
AN8830 : -----SKILLRLRUMIGRRRUDHAECQQLSLMSTWID--FRFRERKILADKKGGPNATASLVLYKGRCCQIVGRGAFGLVRLSHRVDEK-----LSKSEQIVAV : 272
Hal15  : AVGVVEEKLNNASELRKGLSENTKGNNGEGCSNENKVEDDDTEGACTNDDTSKRECS--RYGRSGVVGAGAYGVVLCRCCKTAKDVLPIYSTYSNGKRLFEAY : 545
          KL 1 L 6      K      S Q S      A      RYGR 6VG GA5G6V4I 4 5AV

AN8830 : KESRRRCETSRKYQRLITSEFCISSSRH--NIHTLLDLDQAKGYCEVMEYCAGDLYTLVLA : 337
Hal15  : KPIAKKQDQILKSLRLITSEILGHSLSHFEANAMIAGNVSPTTPKRVFNAL--NIHKLDLMEYSN--SFVEVMEFCAGDLYSLITRNNISNESNNGSSRLIQTVR : 653
          KE 4 4P      K5 RLITSEF I SL HP      NI6 LD162 5 EVME5CA GDLY3L6

AN8830 : ---ACRLEVP--EADCLERQLMRGVYMHMGVAHRDLKPENLLITHTGLKITDFGNC--ECFRMAWEREPHMTGLCGSPYIAPEEYV--EREFDPRAVDIACGVIYMM : 442
Hal15  : EGSVSGSPHPT--EADCEMRQLLNGVQYMHMGGLIAHGLDKPENLEDSDTEGACTNDDTSKRECS--RYGRSGVVGAGAYGVVLCRCCKTAKDVLPIYSTYSNGKRLFEAY : 762
          L EADC RQL6 GV2YMH G6AH DLKPE6L G LRI DFG F AWER H G GS PY6APEE56 E5DPR VD W CG66Y M

AN8830 : KTGRLWLKLRMBEELFYRHYDEGRHEDGYAPISITHRARCRN-----VYSILNPSRRINSSQILKSEWREIRLCQAGEEGE : 524
Hal15  : VNGQLWLKLRMBEELFYRHYDEGRHEDGYAPISITHRARCRN-----VYSILNPSRRINSSQILKSEWREIRLCQAGEEGE : 855
          G LWR6A E D 54 5L K 5 E L 6Y 1P34RI Q6L S W6R R C
  
```

C



AN8830

Figura R6: Alineación de la secuencia de AN8830 con las secuencias de *hal4* (A) y *hal5* (B) de *S. cerevisiae*. (C) Regiones conservadas encontradas en AN8830.

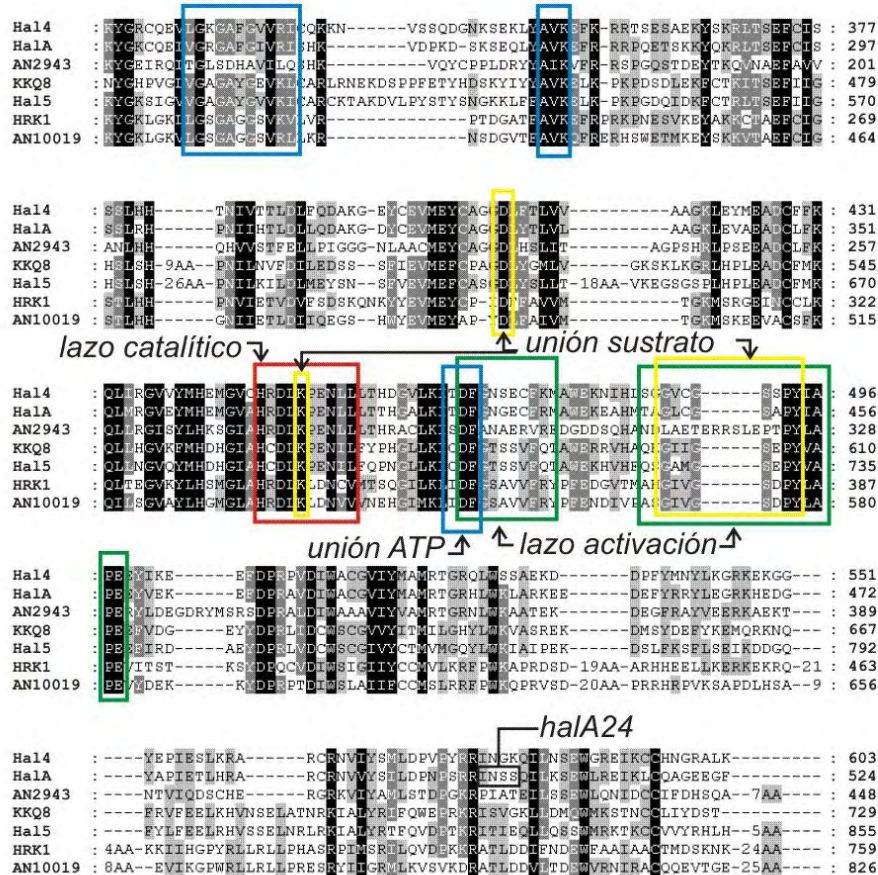
RESULTADOS

Las búsquedas realizadas mostraban que AN8830 codificaba para una posible proteína quinasa, perteneciente a la familia de las proteínas quinasas C (PKc) y que mostraba una gran similitud (figura R6A y R6B) con las quinasas Hal4/Sat4p y Hal5p, que están implicadas en la respuesta a estrés salino en *S. cerevisiae* y también en los homólogos de otras levaduras y hongos [77], por este motivo se designó al *locus* AN8830 como *halA*.

El dominio quinasa comprende aproximadamente desde el aminoácido 245 hasta el 520. También presenta un dominio motor de quinesina desde el aminoácido 130 al 245 semejante al que poseen las quinesinas KISc y KLP2 [113,114]. La secuencia entre aminoácidos 240-520 se utilizó para realizar nuevas búsquedas tipo Blastp para encontrar posibles homólogos y proteínas cercanas en hongos levaduriformes y filamentosos.

Los alineamientos múltiples generados a partir de las diferentes proteínas similares a HalA muestran que estos posibles homólogos presentan una región N-terminal pobremente conservada. La región más conservada es el dominio Ser-Thr quinasa (figura R7) y un alineamiento múltiple permitió identificar los posibles residuos que formarían parte del sitio de unión a ATP (residuos 245-255, 271-273, 386-388), de las zonas de unión de sustrato (residuos 330, 371, 407-414) y lazos catalíticos (residuos 367-376) y de activación (residuos 387-396, 405-418) presentes en una proteína quinasa están también altamente conservados en AN8830 (figura R7) [115].

A



B

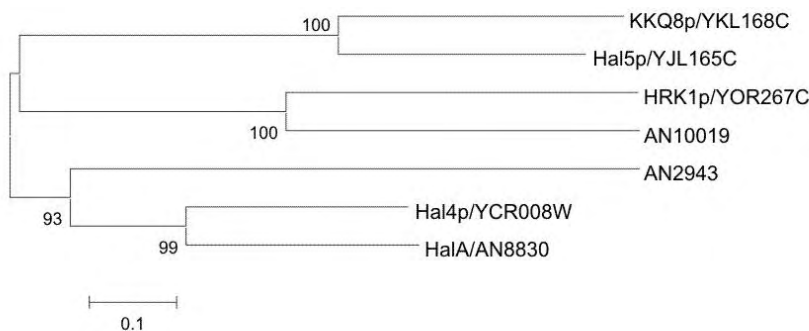


Figura R7: A) Resultado de las búsquedas realizadas usando las secuencias de aminoácidos de HalA, Hal4p y Hal5p en las bases de datos de *Aspergillus* y *S. cerevisiae*. Existe una gran similitud con tres proteínas quinasas, dos de ellas presentes en el hongo. B) Alineamiento de las distintas quinasas encontradas en *Aspergillus nidulans* y *S. cerevisiae* indicando además los residuos cuya presencia es esencial para la función quinasa. Las coordenadas indicadas se refieren al dominio quinasa.

RESULTADOS

Las búsquedas usando las secuencias de aminoácidos de HalA, Hal4p y Hal5p en las bases de datos de *Aspergillus* y *S. cerevisiae* revelan la presencia de, al menos, tres quinasas muy relacionadas. AN8830, *halA*, y el gen AN2943 codifican proteínas con gran similitud a la proteína de levadura Hal4/Sit4p (similitud del 57% y el 37%, respectivamente) y con menor grado a Hal5p (ambas en torno al 28% de similitud). Sin embargo, también presentan niveles significativos de similitud con una quinasa putativa de función desconocida llamada KKQ8p de *S. cerevisiae*. La tercera quinasa estrechamente relacionada encontrada en las búsquedas está codificada por AN10019, que presenta similitud con Hrk1p, una quinasa que regula la activación de la H⁺-ATPasa de membrana Pma1p en respuesta al metabolismo de glucosa [116] (figura R7).

La mutación *halA24* debe generar una proteína mutante con una duplicación de 4 residuos, ⁵⁰⁰INSS⁵⁰³, en la región C-terminal del dominio quinasa, distante, en términos de estructura primaria, de los dominios funcionales citados anteriormente en este dominio. Todos estos hallazgos apoyan la teoría de que HalA es una proteína quinasa y que uno de sus papeles en la célula es la regulación de la actividad de los transportadores de cationes de membrana igual que sus putativos homólogos Hal4/5p.

4.5 Análisis funcional de HalA

4.5.1 Estrategia para la generación de la cepa nula *halA*

Para el estudio de la función de la proteína HalA se generó una cepa nula para el gen *halA*. Para ello se construyó un plásmido que contenía una región de 1,5kb correspondiente al extremo 5'UTR del gen *halA* (AN8830) seguido del marcador de selección *pyr-4* de *Neurospora crassa*, procedente del plásmido pFB6, y a continuación un fragmento de 1kb de la región 3'UTR del gen. La región 5'UTR se amplificó a partir [90]

de DNA-g con los oligonucleótidos DHALA1 y DHALA2 que portan dianas de restricción *NotI* y *BamHI*, respectivamente, y que conjuntamente amplifican un fragmento de 1,5kb. Un fragmento de 1.280 pb correspondiente a la región 3'UTR de *halA* se amplificó con los oligonucleótidos DHALA3 y SA5, añadiendo el primer oligonucleótido una diana de restricción *BamHI*. El fragmento de la región 5'UTR se digirió con los enzimas de restricción *NotI* y *BamHI* y el fragmento de la región 3'UTR con los enzimas *BamHI* y *EcoRI* (diana interna del fragmento). Ambos fragmentos digeridos fueron purificados y ligados al plásmido pBS-SK+ abierto con los enzimas *NotI* y *EcoRI*, dando lugar así al plásmido pBS-UTRs-HalA. Este plásmido se digirió con el enzima *BamHI* y se introdujo el fragmento que contiene el gen *pyr-4* de *Neurospora crassa* [117]. El plásmido resultante se denominó pBS-ΔhalA. El gen *pyr-4* se orientó respecto a las dos regiones UTR y se seleccionaron plásmidos recombinantes con ambas orientaciones. Para reemplazar la secuencia codificante del gen *halA* se transformó el hongo con el fragmento *NotI-EcoRI* del plásmido que contiene la construcción 5'UTR::*pyr-4*::3'UTR (ver figura R8). Se realizaron diversos experimentos de transformación pero no se obtuvieron transformantes con un reemplazamiento limpio del gen *halA* por el marcador de selección.

Consecuentemente, para obtener cepas nulas *halA* se siguió otra aproximación experimental. Se procedió a dividir el casete de transformación en dos fragmentos solapantes en la región del gen *pyr-4*. Cada fragmento contiene una región de *pyr-4* que no complementa por sí sola la mutación *pyrG89*. Así los transformantes *pyrG*⁺ tendrían que haber reclutado la maquinaria de recombinación para reparar el gen *pyr-4* y este evento favorecería la recombinación entre las regiones homólogas 5' y 3'UTR de la construcción con las respectivas genómicas del locus *halA*.

RESULTADOS

Mediante PCR, utilizando el plásmido pBS- Δ halA como molde, se generaron los dos fragmentos solapantes en una región de 150 pb dentro del marcador de selección *pyr-4* (figura R8) y se transformó la cepa MAD782 (*yA2*, *pabaA1*, *pyrG89*). Se obtuvieron transformantes en las placas de regeneración y tras su purificación a homocariosis se analizaron por southern blot. En esta ocasión un número elevado de transformantes portaban un alelo nulo de *halA*, por lo tanto se concluyó que dicha deleción era viable y que los anteriores resultados se debían a un problema de recombinación del casete de deleción en dicho *locus*.

Las diferentes cepas Δ halA aisladas mostraron un fenotipo similar al observado con la cepa *halA24* (ver a continuación) por lo que se puede concluir que la mutación *halA24* es una mutación de pérdida de función de la proteína.

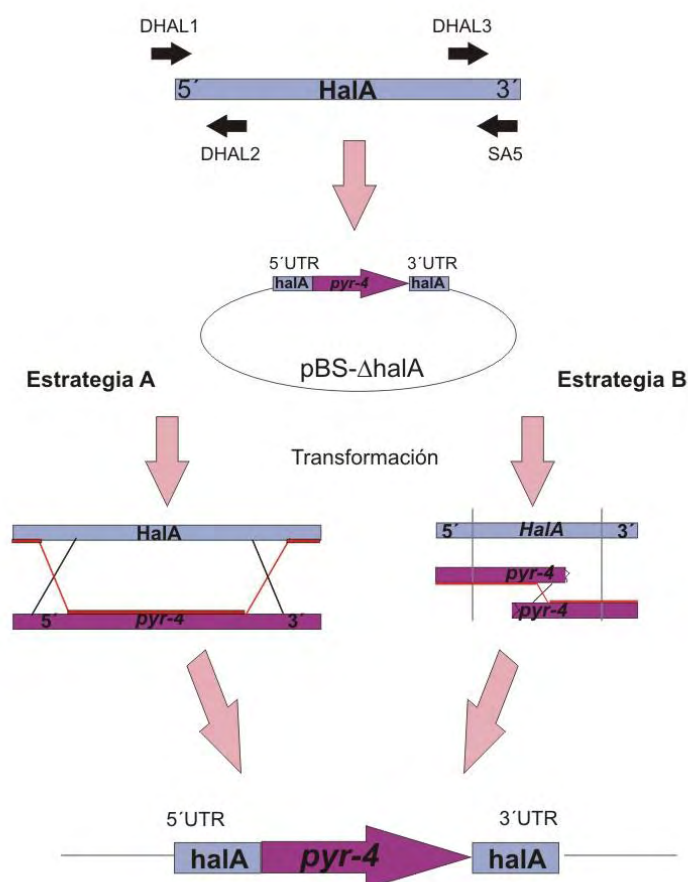


Figura R8: Esquema de las dos estrategias utilizadas para construir la cepa nula para la proteína HalA. A partir del plásmido pBS- Δ HalA se transformó directamente la cepa silvestre del hongo (A) o bien se realizaron fragmentos solapantes del gen *pyr-4* para favorecer la recombinación entre regiones homólogas.

4.5.2 Papel de HalA en la respuesta a estrés catiónico

En el apartado 4.4 se mostraba la similitud de HalA con las quinasas de levadura Hal4p/Hal5p. A continuación se procedió a determinar si HalA tenía funciones equivalentes en *Aspergillus* a las que desempeñaban Hal4p/Hal5p en la levadura *S. cerevisiae*.

Una vez que teníamos construida la cepa nula de esta proteína se analizó el fenotipo que presentaban la cepa silvestre *halA* (MAD1440), el mutante *halA24* (MAD1124) y la cepa nula, $\Delta halA$ (MAD3231), frente a sensibilidad o resistencia a diferentes concentraciones de cationes, tanto monovalentes como divalentes, para tratar de analizar el papel de esta proteína en la homeostasis iónica del hongo (figura R9).

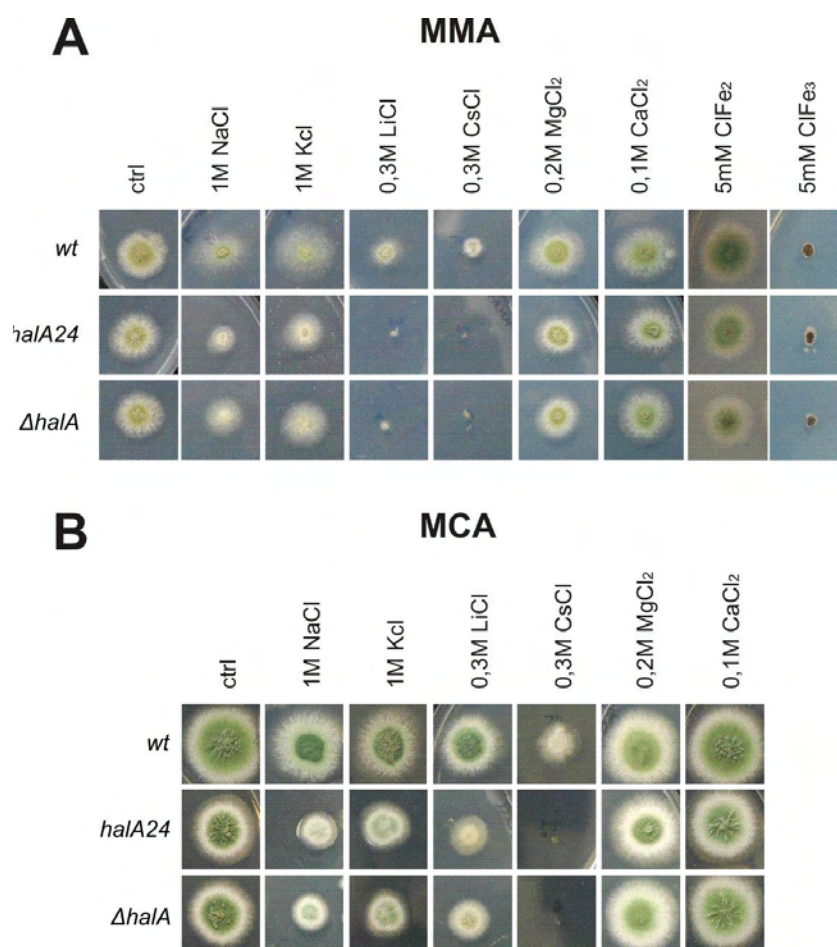


Figura R9: Test de crecimiento en placa tras 48h a 37°C de las cepas silvestre (MAD1440), mutante (MAD 1124) y nula de *halA* (MAD3231) en MMA (A) y MCA (B) suplementados con diferentes cationes.

RESULTADOS

En medio mínimo se observó una mayor sensibilidad a los diferentes cationes y nos permitió observar de manera más clara las diferencias entre los crecimientos con los distintos cationes. Se analizaron concentraciones superiores a las presentes en la célula de forma normal (ver introducción apartado 1.2.1). En este análisis se utilizó tanto medio mínimo como medio complejo. En medio mínimo, la cepa *halA24* fue sensible a niveles elevados Na^+ , K^+ (1M) y extremadamente sensible a Li^+ y Cs^+ (300mM), mientras que tan solo se observó un leve efecto inhibitorio en el crecimiento en medio suplementado con el catión bivalente Mg^{2+} (200mM) o con Ca^{2+} (100mM). Respecto al ion ferroso (Fe^{2+}) o férrico (Fe^{3+}) no se observan cambios en la sensibilidad o resistencia a estos cationes hierro respecto a la cepa silvestre.

Indicar que todos los compuestos se usaron como sales de cloro. El fenotipo de sensibilidad a Li^+ observado en medio mínimo fue atenuado cuando se utilizó medio completo. Sin embargo, los altos niveles de Na^+ y K^+ en medio completo causaron un crecimiento colonial compacto para la cepa mutante *halA24* mientras que no se observó ningún efecto cuando se suplementó el medio completo con Mg^{2+} o Ca^{2+} . El fenotipo de la cepa mutante *halA24* es muy similar al mostrado por las cepas mutantes de levadura en ambos genes *hal4* y *hal5* [92].

4.5.3 Papel de HalA en la utilización de fuentes de nitrógeno

Las proteínas Hal4p/Hal5p pertenecen a la familia de las proteínas quinasas reactivadoras de la permeasa de nitrógeno, NPR [118]. Esta familia de proteínas se encargan de estabilizar numerosos transportadores de membrana de aminoácidos impidiendo su degradación mediada por proceso de ubiquitinación.

Pérez-Valle y colaboradores demostraron como cepas de levadura *S. cerevisiae* deficientes en el sistema de quinasas Hal4/Hal5 mostraban una alteración de la [94]

localización de transportadores de nutrientes como Can1p (permeasa de arginina), Fur4p (permeasa de uracilo) y Hxt1p (transportador de glucosa) [92]. En la cepa silvestre los transportadores se localizaron mayoritariamente en la membrana plasmática mientras que en una cepa mutante *hal4/hal5* los transportadores se acumulaban en la vacuola, viéndose afectado el transporte al interior de la célula y por tanto la capacidad de crecimiento en medios conteniendo los compuestos anteriormente citados como únicas/preferenciales fuentes de nitrógeno.

Dado que habíamos comprobado que HalA participaba en la regulación de la homeostasis de cationes del mismo modo que Hal4p/Hal5p estaba implicada en esta regulación, decidimos analizar si también tenía un papel en la utilización de distintas fuentes de nitrógeno. Para ello analizamos la capacidad de crecimiento de las cepas mutantes *halA24* y $\Delta halA$ en medio mínimo conteniendo diferentes fuentes de nitrógeno, tanto de origen orgánico como inorgánico (figura R10).

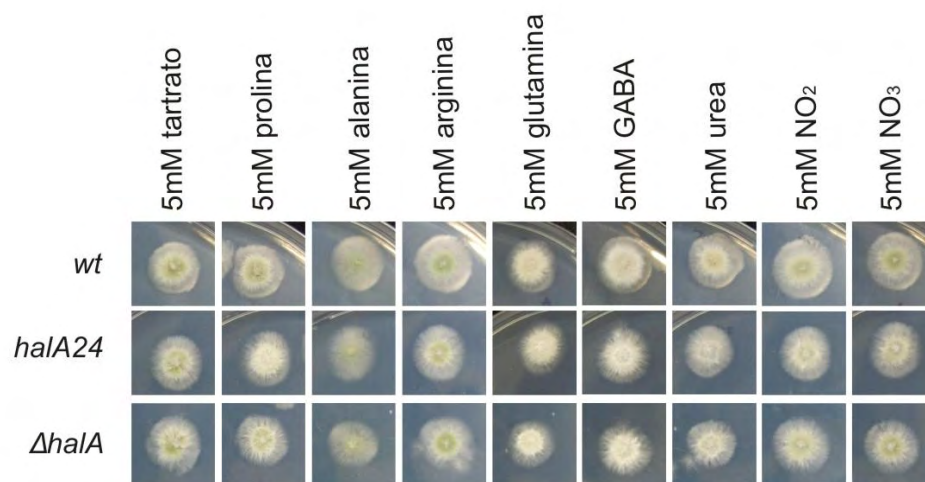


Figura R10: Crecimiento de las distintas cepas en placas con medio mínimo sólido después de una incubación de 48h a 37°C. A este medio se le añadieron diferentes compuestos como principales fuentes de nitrógeno según se indica en la parte superior de la figura.

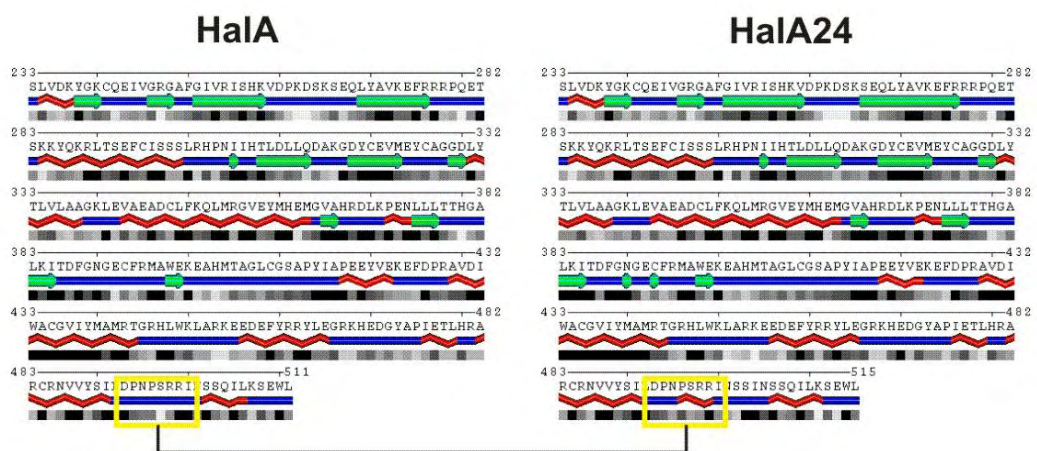
Como se aprecia en la figura R10, no se detectó defectos en el crecimiento radial de las colonias de las cepas *halA24* y $\Delta halA$ frente a la cepa MAD1440 utilizada como control de fenotipo silvestre *halA*. Las cepas mutantes *halA*⁻ pueden utilizar tanto las distintas fuentes de nitrógeno origen mineral: NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , como las fuentes de N orgánicas: tartrato amónico, urea o los aminoácidos Gln, Pro, Arg o ácido γ -aminobutírico, β -alanina. Por lo tanto, existe una notable diferencia entre el fenotipo *halA*⁻ en *A. nidulans* y el fenotipo descrito en el doble mutante $\Delta hal4$, $\Delta hal5$ en *S. cerevisiae* [92] ya que en ausencia de estas quinasas se altera tanto el transporte de diferentes cationes como la utilización de distintas fuentes de nitrógeno, mientras que en los mutantes *halA*⁻ sólo se observan fenotipos relacionados con la respuesta al estrés ocasionado por exceso de cationes.

4.5.4 Modelado de la proteína mutante y silvestre HalA.

Para intentar determinar un posible efecto estructural de la mutación *halA24* se realizó un modelado de la estructura terciaria de HalA en ambas formas silvestre y mutante. Como primer paso se realizó una predicción de la estructura secundaria de las dos formas de HalA utilizando el programa Polyview (www.polybytes.com) (figura R11). En la predicción de estructura secundaria no aparecen diferencias significativas, tan solo se aprecia que en el modelo de la proteína mutante se forma una nueva α -hélice en la zona de la inserción, dando lugar a una proteína con 12 α -helices que según estos modelos no tiene alterada la estructura tridimensional de la quinasa (figura R11 panel B). Esta nueva porción de α -hélice aparece representada en la figura R11 panel A con un recuadro amarillo. Tanto las predicciones de β -láminas como las regiones desorganizadas en ambas proteínas se mantienen inalteradas. En estas predicciones de estructuras secundarias no se detectaban cambios significativos que pudieran explicar el

fenotipo de pérdida de función observado en HalA24. Para el análisis de la estructura terciaria de la proteína se realizó un modelado de la secuencia tanto de la proteína silvestre como de la mutante usando como molde la estructura de la proteína CG17176 de *D. melanogaster*. El programa (Swiss-model) elige de forma automática la proteína que utilizará como molde.

A



B



Figura R11: A) Predicciones de secuencia secundaria para la proteína HalA y para la proteína con la mutación *halA24*. Las flechas verdes indican regiones de β -láminas y las zonas coloreadas en rojo representan regiones de α -hélices. B) Modelado de la estructura tridimensional de la proteína silvestre y de la mutante indicando la zona donde se localiza la mutación (en color verde) así como los principales dominios de la proteína quinasa (en un círculo rojo).

RESULTADOS

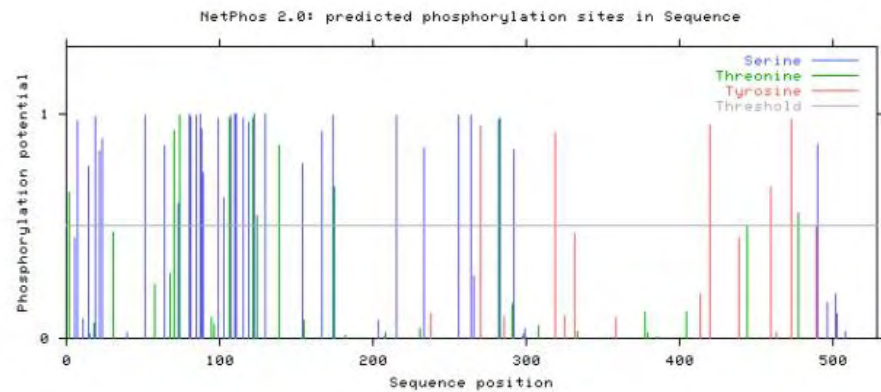
Solo se observaron modificaciones menores en la estructura terciaria de la proteína al estar presente la mutación *halA24*, (figura R11 panel B), pero en ningún caso estas modificaciones parecen estar afectando a los principales dominios funcionales de la proteína quinasa (señalados en un círculo rojo en el panel B de la figura R11).

HalA es muy probablemente una proteína quinasa, y por tanto tiene la función de fosforilar otras proteínas. Es posible que la propia proteína quinasa sea susceptible de ser fosforilada a su vez por otra quinasa como parte de su regulación o incluso que la misma proteína quinasa se fosfore a sí misma como un mecanismo de autorregulación. Para analizar si la mutación *halA24* estaba alterando alguna de estas dianas de fosforilación se realizó una predicción de los sitios de fosforilación de serina, treonina y tirosina de la proteína, utilizando para ello el programa NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>). La predicción mostró que los residuos insertados por la mutación *halA24* generaban una nueva diana donde se pronosticaba un residuo de serina candidato para ser fosforilado (figura R12). Por lo tanto en futuros experimentos se tendrá en cuenta determinar el grado de fosforilación de HalA y de la forma mutante HalA24 y se analizará mediante técnicas de “western-blot” si existe una diferencia en la migración de estas proteínas que pueda estar indicando la implicación de un proceso de fosforilación.

Aunque aparentemente el efecto de esta mutación es local, ésta debe causar un efecto general mayor en el dominio quinasa, ya que *halA24* presenta un fenotipo de pérdida de función idéntico al alelo nulo.

Las predicciones realizadas no han permitido establecer una correlación firme entre pérdida de función y una posible alteración estructural, la naturaleza molecular de la mutación *halA24* es muy interesante dado que proporciona información adicional para esta familia de quinasas sobre dominios funcionales alejados de los residuos implicados en la actividad quinasa.

A



B

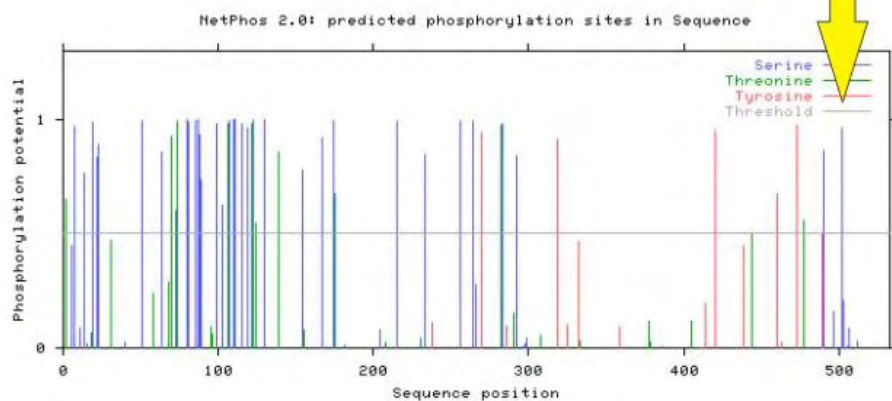


Figura R12: Gráficos de predicción de sitios de fosforilación. En azul aparecen los posibles sitios de fosforilación de la serina, en verde los de la treonina y en rojo los de la tirosina. La línea horizontal marca el umbral que han de sobrepasar los aminoácidos para ser considerados como sitios de fosforilación. La figura muestra la predicción obtenida para la proteína silvestre (A) y para la proteína mutante (B).

4.6 PAPEL DE LA PROTEINA QUINASA HalA EN LA HOMEOSTASIS DE POTASIO Y SODIO.

4.6.1 Efecto de la ausencia de sodio y potasio en el crecimiento de las cepas.

La concentración de potasio es el principal determinante de parámetros fisiológicos y morfológicos tales como el volumen celular, la turgencia y la fuerza iónica citoplasmática. Estos factores además juegan un papel clave en la capa de hidratación óptima de macromoléculas y membranas. El catión potasio se encuentra presente en el interior celular en concentraciones muy altas de forma prácticamente constante. El umbral de toxicidad para cationes monovalentes como el sodio y el litio es comparativamente mucho menor que para el potasio (ver Introducción). La rígida regulación de los niveles sodio y litio en el citosol tiene como objetivo la protección de enzimas intracelulares esenciales, como es el caso de las fosfatasas [119,120].

Puesto que las cepas mutantes *halA* muestran sensibilidad a altas concentraciones de sodio o en potasio, especialmente en medio complejo (ver figura R9), se decidió analizar si la función de la proteína HalA sería necesaria ante un defecto en la concentración de estos cationes. Para generar condiciones limitantes de potasio se modificó el medio de cultivo estándar utilizando una solución de sales diluida diez veces. De esta forma se obtiene una concentración aproximada de 1,7mM de cloruro potásico, 1mM de fosfato potásico y 0,3M de molibdato sódico en el medio. La figura R13 muestra que las cepas mutantes *halA24* y $\Delta halA$, comparadas con la cepa silvestre, poseen un crecimiento colonial menos vigoroso y su capacidad de esporulación también se ve mermada. En esas condiciones suplementamos los medios con concentraciones de potasio (en forma de cloruro potásico) similares a las que encontramos fisiológicamente, 10mM, o bien una concentración de potasio elevada, 100mM, para analizar si la

[100]

presencia del catión en el medio extracelular era capaz de revertir el efecto observado en el medio con 1/10 de la concentración de sales de potasio original.

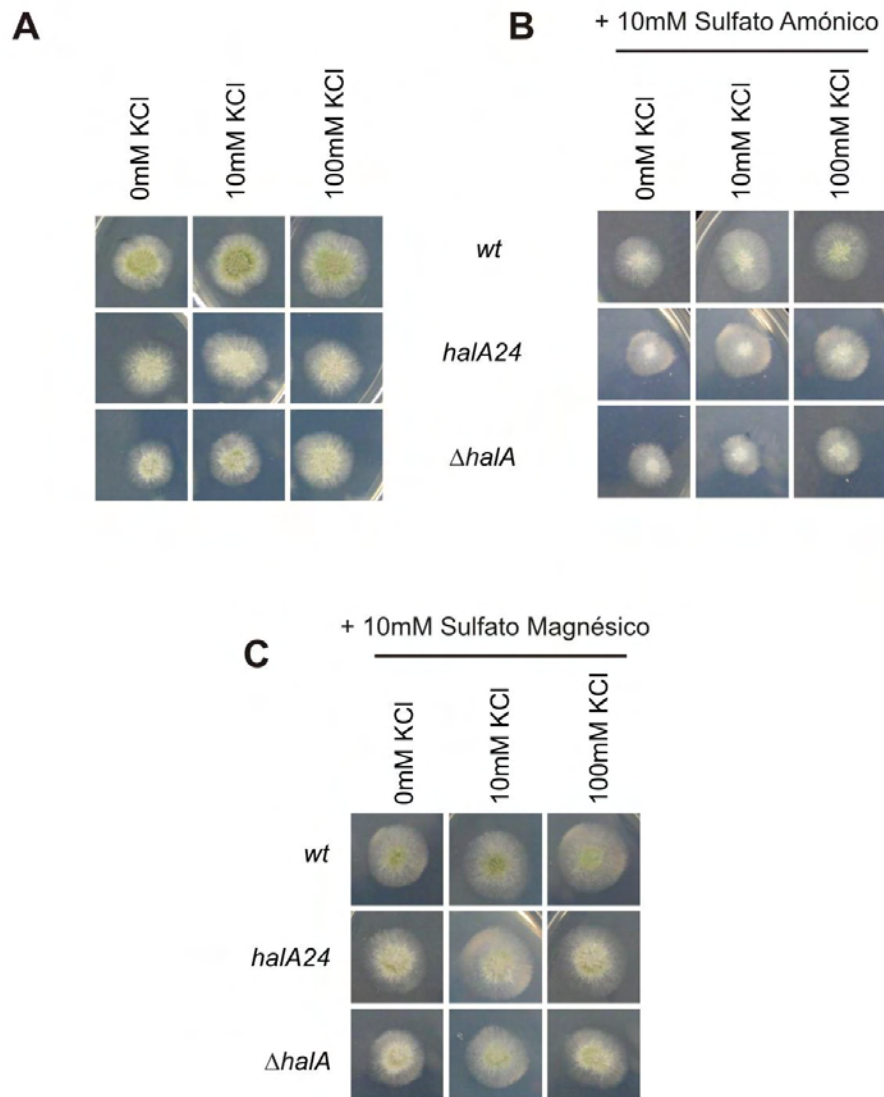


Figura R13: Crecimiento de la cepa silvestre (MAD1440), mutante *halA24* (MAD1124) y nula *halA* (MAD3231) en MMA en el cual la concentración de las distintas sales está reducida a la décima parte (MMA 1/10). Este MMA 1/10 fue suplementado con 10mM de sulfato amónico (B) y con 10mM de sulfato magnésico (C).

Observamos que el potasio por sí solo no era capaz de recuperar el crecimiento silvestre en las cepas mutantes de HalA y nos planteamos estudiar el comportamiento de estas cepas en ese medio con una concentración 1/10 de sales suplementado bien con

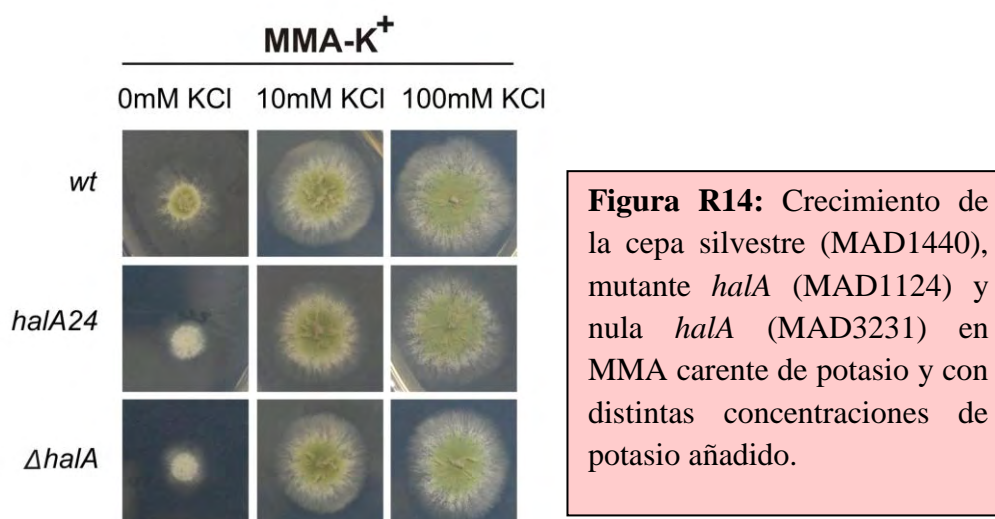
sulfato amónico 10mM, bien con sulfato magnésico 10mM tratando de revertir esa reducción del crecimiento de los mutantes. Además añadíamos las concentraciones de 10mM y 100mM de potasio para estudiar si el potasio en combinación con alguno de estos suplementos (sulfato amónico o sulfato magnésico) era capaz de recuperar el crecimiento silvestre de las cepas mutantes (figura R13).

Ninguna de las tres composiciones de medio lograba revertir completamente el crecimiento anómalo de las cepas mutantes en HalA. La solución de sales proporciona la cantidad adecuada de iones que precisa una cepa *halA* silvestre para promover su crecimiento vegetativo y conidial. La reducción en la cantidad de potasio no es la causa única del crecimiento limitado de las cepas *halA*⁻, por lo tanto hay que realizar experimentos en los que se elimine el K⁺ de la solución de sales manteniendo las concentraciones de los otros iones.

4.6.2. Efecto de la ausencia de potasio en el crecimiento de las cepas *halA*⁻.

Para intentar comprender el efecto de la ausencia de K⁺, se reemplazaron las sales de potasio por sales de sodio (concentración de 27 mM de Na⁺ en medio mínimo) (figura R14).

En este medio con bajo contenido en potasio, donde la única fuente de potasio era la contaminación química de los constituyentes del medio, las cepas *halA24* y la cepa nula de *halA* presentaban una inhibición de su crecimiento radial, y este fenotipo fue suprimido con la adición de este catión al medio (figura R14). Por lo tanto, HalA se debe precisar para el correcto desarrollo el hongo a una baja concentración de potasio.



Tanto un exceso como un defecto en la concentración de potasio en el medio tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de las cepas mutantes en *halA*. Esta observación sugiere una deficiencia en el transporte de potasio de alta afinidad. La sensibilidad a cationes de Na⁺ y K⁺ podría deberse a deficiencias de transporte en ausencia de un *halA* activo. Como los niveles intracelulares de Na⁺ y K⁺ no son independientes, la sensibilidad a sodio podría ser entonces una consecuencia directa de una tasa de absorción limitada o reducida de iones potasio debida, muy probablemente, a una alteración en el sistema de transporte de potasio de alta afinidad.

4.6.3. Estudio del transporte de sodio y potasio en *A. nidulans*.

Para comprobar esta hipótesis se analizó la toma de K⁺ midiendo los niveles intracelulares de su análogo Rb⁺ [50,82]. Las medidas de transporte de rubidio y litio se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Ramos en la Universidad de Córdoba, expertos en esta técnica de medida. La toma de rubidio no se vio afectada cuando el medio contenía 10 mM K⁺, sin embargo bajo condiciones limitantes de K⁺ (10 μM) la toma de rubidio se redujo en la cepa *halA*⁻ comparada con la cepa silvestre para un rango de concentraciones de rubidio, 0,3 mM-0,8 mM (figura R15). En todos los casos, la cepa

RESULTADOS

mutante *halA*⁻ mostró menores niveles intracelulares de rubidio que la cepa silvestre, reflejando una posible reducción en el transporte intracelular de rubidio y, por extensión de K⁺, lo que fue confirmado midiendo la cinética de la toma de rubidio en la cepa mutante *halA24* y en la silvestre (figura R15).

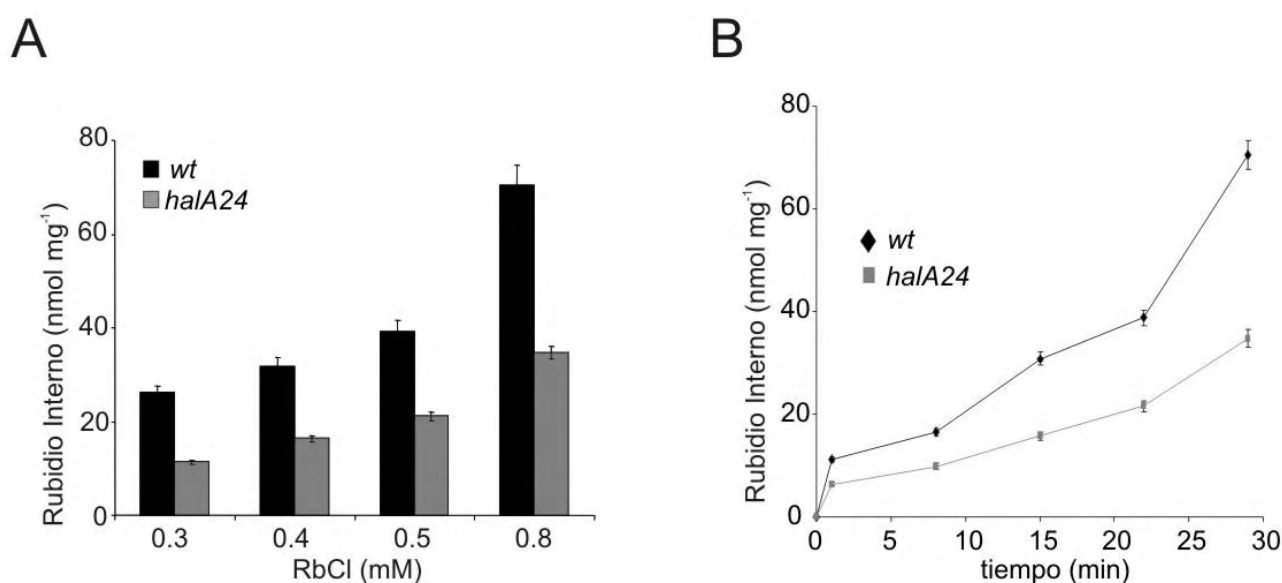


Figura R15: A) Estudio de la toma de potasio usando rubidio como su análogo en la cepa silvestre MAD1440 y en la cepa mutante MAD1124. B) Cinética de la toma de rubidio.

El efecto tóxico de los altos niveles de Li⁺ en las cepas *halA*⁻ indican un defecto en la regulación de las reservas intracelulares de Na⁺, ya que un bajo flujo de Na⁺ normalmente da lugar a toxicidad en las células fúngicas [32]. Determinamos los niveles intracelulares de Li⁺, como indicador análogo de Na⁺, en una cepa *halA*⁻ después de crecerla en medio con niveles no tóxicos de Li⁺ (10 mM). La concentración intracelular de Li⁺ fue tres veces superior en la cepa *halA24* que en la cepa silvestre (figura R16). La disminución en el flujo de Li⁺ medida en la cepa mutante *halA24* frente a los valores obtenidos con la cepa silvestre coincide con el incremento de niveles

intracelulares de Li^+ . Consecuentemente, la sensibilidad mostrada por el mutante *halA*⁻ a altas concentraciones de sodio, podría ser debida a una exportación reducida de los cationes Na^+ (medidos como iones Li^+) lo que originaría la acumulación intracelular de estos cationes a niveles que causasen toxicidad.

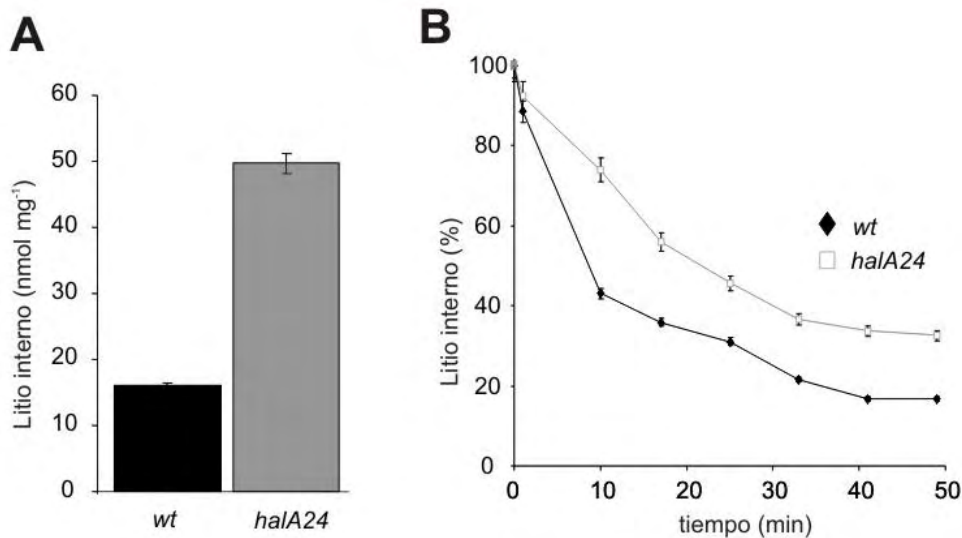


Figura R16: A) Determinación de los niveles intracelulares de sodio usando litio como análogo en una cepa silvestre y en una mutante de *halA*. B) Cinética de la acumulación de litio en la célula.

4.7 REGULACIÓN POR POTASIO DE HalA

Para comprender los mecanismos de respuesta a diferentes niveles de potasio extracelular se analizó si HalA mostraba una modificación a nivel post-transduccional o un cambio en los niveles de expresión como respuesta a este catión. Para estudiar los niveles de HalA se construyó una cepa que expresaba a esta quinasa unida al epítipo 3xHA que permitiría su rápida identificación en “Western-blots” con anticuerpos específicos α -HA. Para realizar el marcaje de la proteína se utilizó el protocolo descrito

RESULTADOS

en el apartado 3.2.4.2 de materiales y métodos. Utilizando los oligonucleótidos GSP1-4HalA se amplificaron las regiones de la parte final y del terminador (F1) (F2) del gen así como el epítipo unido al marcador de selección que se extrajo con GFP1, 2 del plásmido 1503 (figura R17). Después se fusionaron los tres fragmentos (figura R17) y con el fragmento resultante se transformó la cepa MAD1739 según el protocolo descrito en el apartado 3.3.2 de materiales y métodos. La correcta integración de la construcción se verificó por PCR o “Southern-blot”.

Para verificar la funcionalidad de la proteína HalA marcada con el epítipo 3xHA se analizó el fenotipo de la cepa que expresa esta construcción, MAD3235. A continuación se procedió a la detección mediante Western blot de HalA. Todos los transformantes caracterizados previamente expresaban niveles similares de una proteína etiquetada con el epítipo HA y del tamaño esperado.

A continuación, se analizó el efecto de diferentes concentraciones de Na^+ y K^+ sobre los niveles de HalA en extractos proteicos del hongo.

Para el estudio del posibles efecto del Na^+ se creció la cepa MAD3235 en MMA durante 18h a 37°C, a continuación se añadió 100mM sodio al medio (NaCl) y se recogió el micelio tras 15 minutos de incubación en estas nuevas condiciones. Para determinar el efecto del potasio, se cultivó la cepa MAD3235 en MMA- K^+ (18hrs a 37°C) y de forma similar al experimento anterior se añadieron dos concentraciones de potasio, 10 y 100mM (como KCl), recogiendo el micelio para la extracción de proteínas tras 15 minutos de incubación en estas condiciones. Como control en ambos casos se recogió micelio de un cultivo inicial sin adición de sodio o potasio.

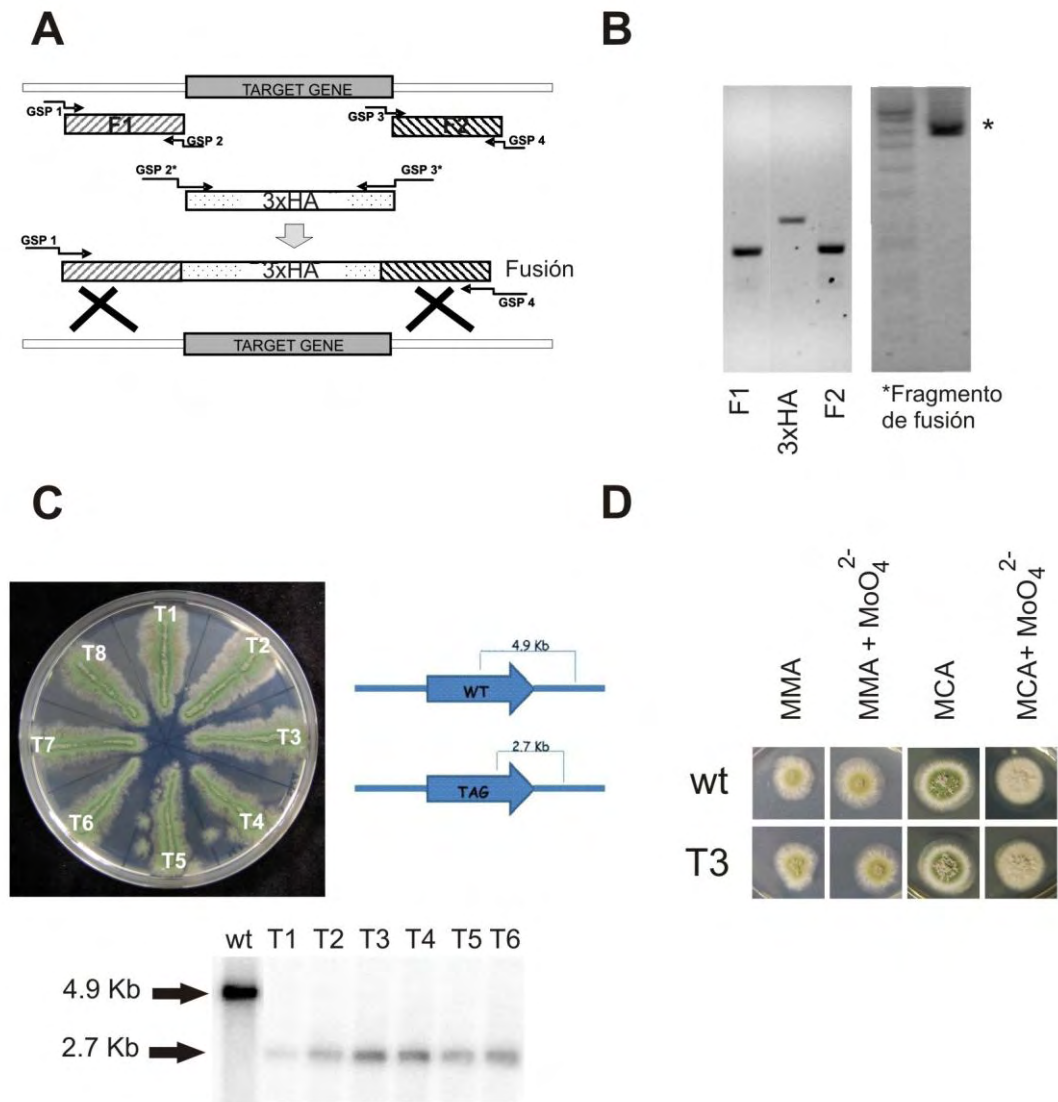


Figura R17: Marcaje de la proteína HalA con el epítipo 3xHA. A) Estrategia de marcaje. B) Fragmentos obtenidos tras las respectivas PCRs. Ver teto para la nomenclatura. C) Transformantes aislados. Estrategia empleada en el southern. Comprobación por “southern blot” de la correcta integración del fragmento generado. T1-T8 representan los transformantes analizados. D) Verificación de la funcionalidad de la cepa obtenida por comparación de fenotipo con una cepa silvestre.

La figura R18 muestra “western-blot” en los que se detecta la proteína HalA::3xHA y en los que no se observaron cambios evidentes en los niveles de expresión de esta proteína de fusión cuando se modificaron las concentraciones externas

RESULTADOS

de los iones sodio o potasio. Los niveles de HalA se comparan con los niveles de actina, detectados con un anticuerpo primario contra la actina de *S. cerevisiae*.

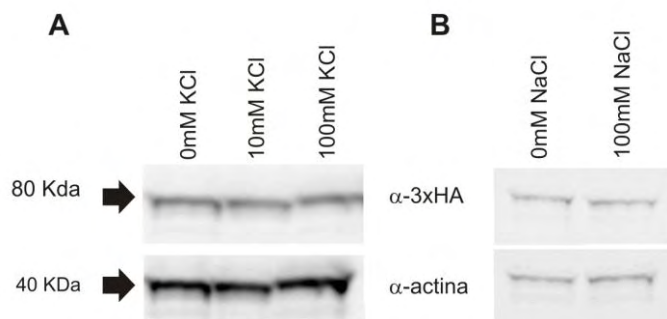


Figura R18: Estudio de la expresión de la proteína HalA en diferentes concentraciones de potasio (A) y de sodio (B) usando la cepa marcada con 3xHA (MAD3235).

La movilidad de las bandas de detección era muy similar entre las diferentes condiciones indicando la ausencia de cambios postraduccionales en HalA, como pudiera ser fosforilación, en respuesta inmediata a cambios en los niveles de Na^+ o K^+ en el medio de cultivo.

4.8 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE HalA

Alternativamente a modificaciones postraduccionales es posible que HalA esté sujeta a una regulación de su localización subcelular como mecanismo de respuesta al estrés catiónico y al mantenimiento de la homeostasis de estos iones.

Para localizar en la célula a HalA se procedió a su etiquetado con la proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo C-terminal. Para realizar el marcaje de la proteína se utilizó el protocolo descrito en el apartado 3.2.4.2 de materiales y métodos. Utilizando los oligonucleótidos GSP1-4HalA para amplificar el gen y GFP1, 2 del plásmido 1439 para el epítipo (figura R18).

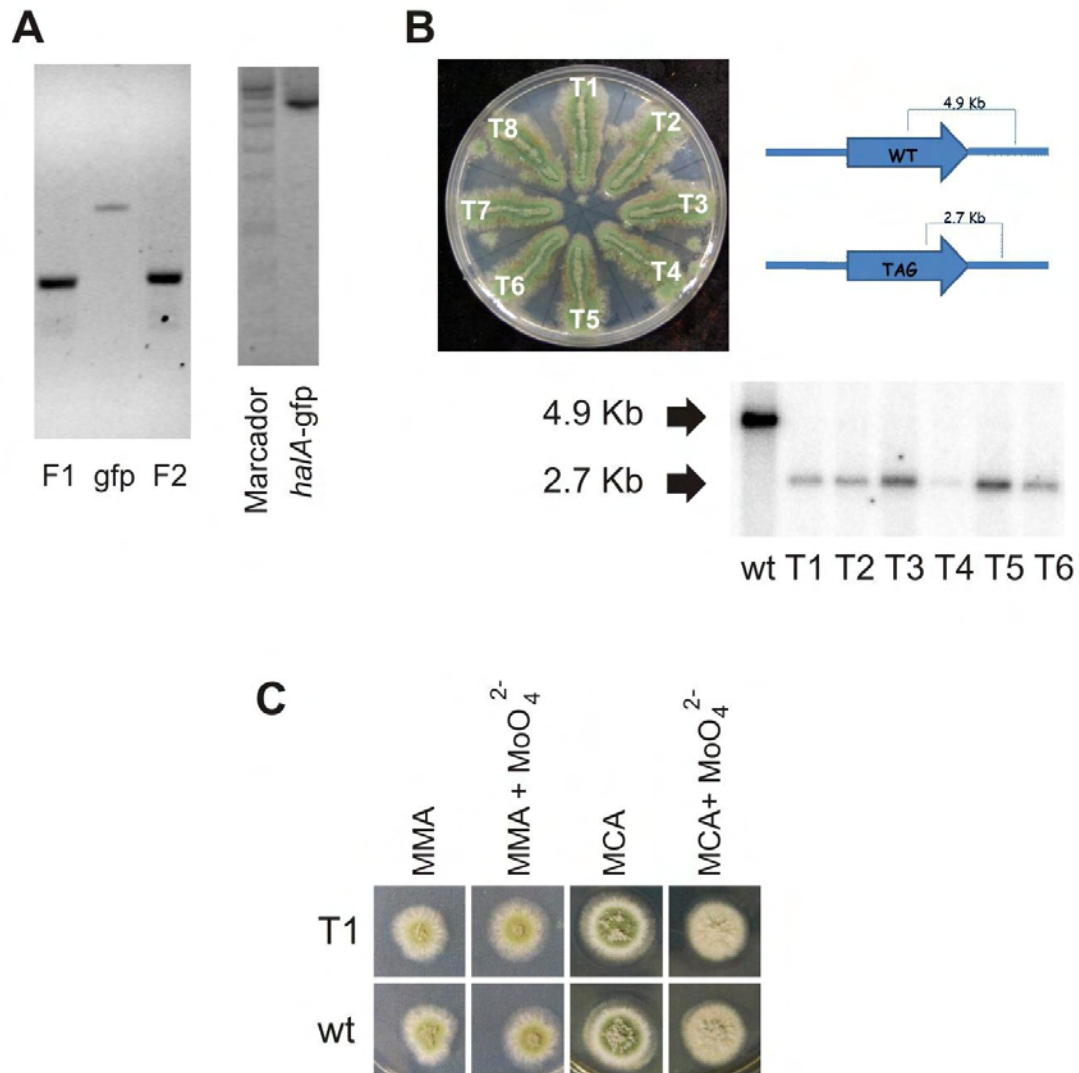


Figura R19: Marcaje de la proteína HalA con el epítipo GFP. A) Fragmentos obtenidos tras las respectivas PCRs. Ver texto para abreviaturas. B) Transformantes aislados. Estrategia empleada en el southern. Comprobación por southern blot de la correcta integración del fragmento generado. T1-T8 representan los transformantes analizados. C) Verificación de la funcionalidad de la cepa obtenida por comparación de fenotipo con una cepa silvestre.

La fusión de fragmentos resultante se transformó la cepa MAD1739 según el protocolo descrito en el apartado 3.3.2 de materiales y métodos. Se verificó la incorporación del fragmento mediante “Southern Blot” y a continuación se analizó la funcionalidad de la proteína HalA etiquetada en aquellas cepas que mostraban la correcta integración de la construcción (seleccionada para esta tesis la cepa MAD3234)

RESULTADOS

de la misma forma que se hizo para MAD3235 (HalA::3xHA), mediante el análisis fenotípico en diferentes condiciones de estrés.

HalA::GFP muestra una distribución citoplasmática prácticamente uniforme que permanece, aparentemente, inalterada cuando la cepa se creció en medio mínimo estándar con niveles reducidos (medio sin sales de K^+), estándar (10 mM) y elevados (100 mM) de K^+ (figura R20 panel B). En el citoplasma se apreciaban zonas donde la fluorescencia estaba ausente, y que dada su forma, sugerían que eran muy probablemente los núcleos de cada compartimento celular (figura R20 panel A). Para determinar este hecho, se visualizaron los núcleos utilizando una versión etiquetada de la histona H1 con la proteína fluorescente Cherry-RFP. Para dicho etiquetado se amplificó la región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *hhoA* (AN2765), codificante de la histona H1. Esta región se marcó con el epítipo Cherry-RFP, proteína fluorescente roja, extraída del plásmido 1827. Para ello se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.2.4.2 y los oligonucleótidos GSP1-4H1 y GFP1,2H1. Con el fragmento obtenido se transformó la cepa MAD3234 que expresa HalA::GFP y de esta forma observar la localización simultánea de HalA y la de los núcleos. Se confirmó que debe existir exclusión nuclear de HalA y que dicha localización no se modificaba tampoco por los cambios de concentración de K^+ en el medio extracelular.

La exclusión nuclear observada también permite hipotetizar sobre la existencia de un mecanismo de exportación nuclear actuando sobre HalA o bien el posible anclaje de HalA a orgánulos o estructuras citoplasmáticas. En primer lugar se verificó la presencia de una señal de exportación nuclear (NES) clásica en HalA. Estas señales son reconocidas por las exportinas de la familia Exp-1/Crm como KapK [121]. Sin embargo, no pudo identificarse ninguna señal de este tipo por lo que se investigó la segunda opción.

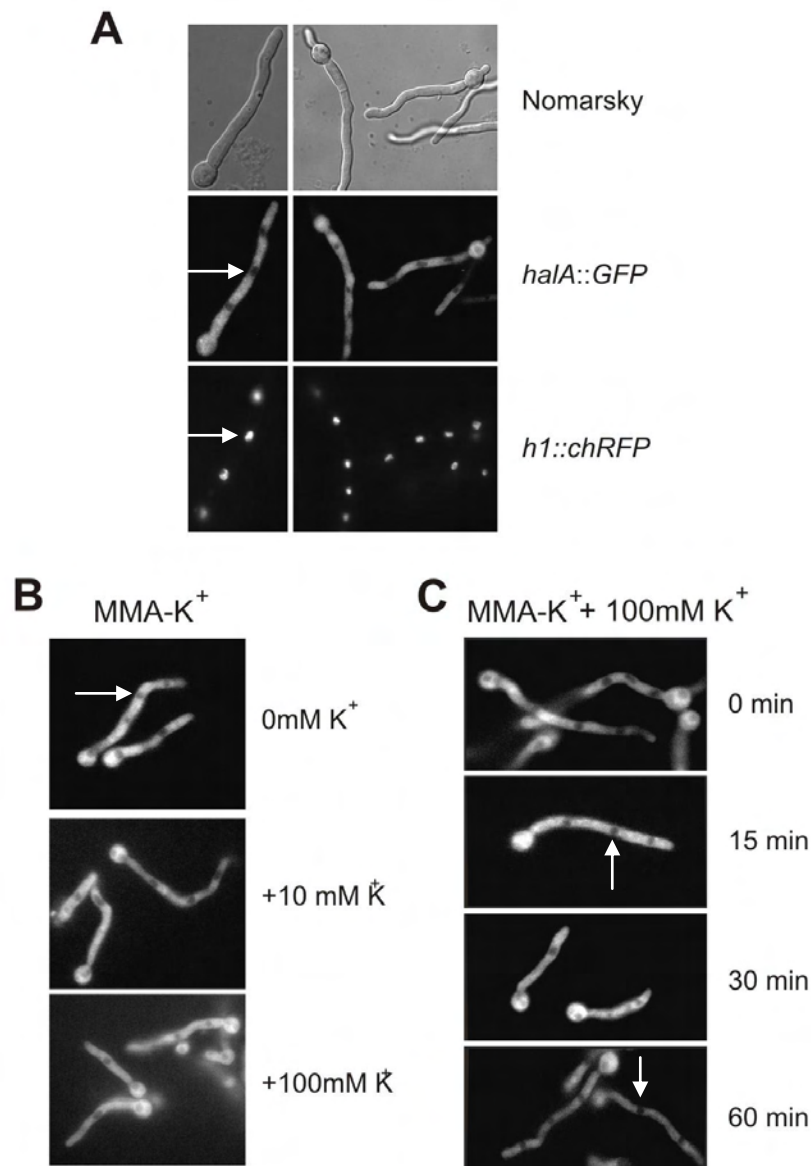


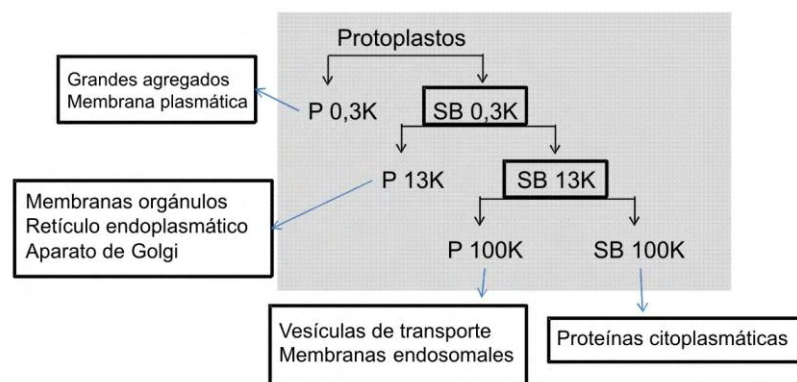
Figura R20: Estudio de la localización celular de la proteína HalA mediante el uso de microscopía de fluorescencia. Se analizó la fluorescencia de la cepa MAD3236 en condiciones normales (A), a diferentes concentraciones de potasio (B) y a diferentes tiempos de incubación con potasio (C). Las flechas blancas señalan los núcleos celulares.

Para determinar la existencia de una localización orgánulo-dependiente, se realizaron fraccionamientos celulares utilizando la cepa que expresaba la quimera HalA::3xHA. Los fraccionamientos celulares se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.4.3. En este tipo de fraccionamiento celular se separan grandes complejos, diferentes orgánulos y membranas de proteínas solubles. La fracción ET

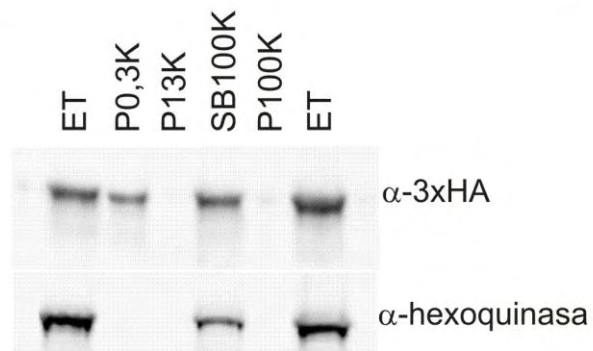
RESULTADOS

representa el extracto total de proteína presente en la muestra. En la fracción P0,3K se encuentran grandes agregados y fragmentos de la membrana plasmática. En las fracciones P13K y P100K sedimentan diferentes orgánulos membranosos y restos de membranas. Finalmente en la fracción SB100K se concentran las proteínas citoplasmáticas solubles.

A



B



C

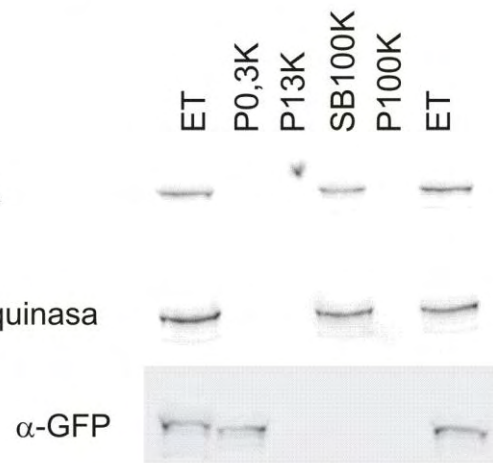


Figura R21: (A) Esquema del proceso de fraccionamiento celular. Resultado del fraccionamiento de la cepa MAD3235 en concentraciones normales de potasio (B) y con concentraciones elevadas de potasio (C), junto con el fraccionamiento de una proteína que se conoce que se localiza en la membrana plasmática celular, (PH^{PLCδ})_{2x} y que se detecta con GFP..

Inicialmente en estos experimentos de fraccionamiento se utilizaron micelios crecidos en medios con 10mM de K^+ , las condiciones estándar. Como muestra la figura R20, HalA pudo ser detectada en dos fracciones diferentes. Una subpoblación de HalA puede ser considerada como proteína soluble citoplasmática dado que colocaliza con la hexoquinasa, nuestro estándar de proteína soluble [49]. HalA fue también detectada en la fracción donde sedimentan grandes complejos proteicos asociados a membranas y la propia membrana plasmática. Para verificar que esta fracción contenía membrana plasmática se detectó al marcador GFP-2x(PH^{PLC δ}), una repetición en tándem del dominio plectrina de la fosfolipasa humana fusionado a GFP y que se ha demostrado que se localiza de forma exclusiva en la membrana plasmática de *A. nidulans* [122] (figura R21).

El análisis de la localización de HalA en condiciones de crecimiento con una concentración elevada de potasio mostró un cambio en la distribución de esta quinasa en los experimentos de fraccionamiento. Así, con la adición al medio de 100mM de KCl HalA se localizó de forma prácticamente exclusiva en la fracción soluble (figura R21). Estos resultados muestran una distribución potasio dependiente de HalA en la célula, y sugieren un posible mecanismo regulatorio de la actividad de HalA a través de su aproximación a la membrana plasmática o su localización puramente citoplásmica y soluble. Es posible entonces que en condiciones limitantes de potasio en el medio, HalA podría dirigirse hacia la membrana plasmática para desempeñar un papel, por ejemplo, en la activación de transportadores de membrana de este catión. Es posible que este papel regulador sea llevado a cabo bien directamente o a través de la interacción con otros factores, como por ejemplo otras quinasas.

4.9 IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE LOS TRANSPORTADORES DE POTASIO

4.9.1 Identificación de transportadores de potasio en *Aspergillus nidulans*.

Dado que HalA puede localizarse asociada a la membrana plasmática y que en las cepas mutantes *halA*⁻ la toma de K⁺ está afectada era razonable plantear un estudio de la implicación de HalA en la regulación de los transportadores de potasio de *Aspergillus*.

Para abordar este trabajo en primer lugar se identificaron los posibles transportadores en *A. nidulans*, dado que se carecía de información previa acerca de los posibles transportadores de potasio existentes en este hongo. Utilizando la herramienta de WU-BLAST2 Search y las secuencias aminoacídicas de los transportadores de potasio Trk1 y Trk2 de *S. cerevisiae* y *S. pombe* [17,19] se buscó en la base de datos de *Aspergillus* utilizando el algoritmo Blastp. Se obtuvieron tres loci candidatos que codificarían para proteínas con un notable elevado de similitud en todos los casos (figura R22). Estos fueron denominados como *trkA* al locus AN5636, *trkB* al locus AN8029 y *trkC* al locus AN10136.

Basándose en la comparación entre las secuencias de los diferentes Trks (figura R22A) no se pudo determinar el posible homólogo más próximo de los genes de *A. nidulans* a los de levaduras. Para caracterizar la estructura de estos transportadores de potasio se procedió a la realización de alineamientos múltiples con otros posibles transportadores de cationes y a la predicción de dominios transmembrana, utilizando en este último caso los recursos en la red <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>.

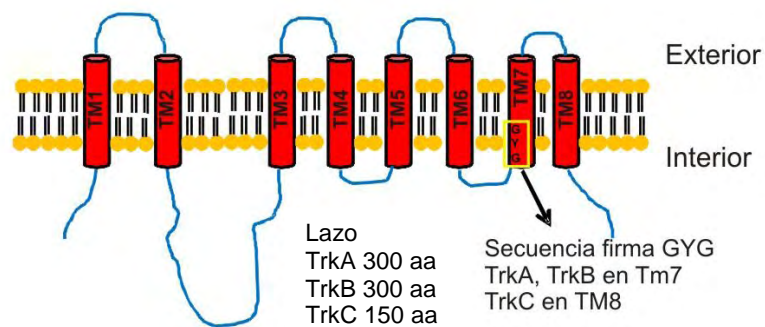
A

SECUENCIA USADA EN LA BÚSQUEDA

	Trk1 <i>S. cerevisiae</i> (YJL129C)		Trk2 <i>S. cerevisiae</i> (YKR050W)		Trk1 <i>S. pombe</i> (SPAC3F10.02c)		Trk2 <i>S. pombe</i> (SPAC1639.02c)	
GEN	Score	Value	Score	Value	Score	Value	Score	Value
AN8029	855	5.3e-162	827	2.2e-157	1069	1.9e-139	1058	8.8e-127
AN5636	631	6.0e-107	607	3.3e-107	914	8.3e-100	885	6.8e-100
AN10136	502	2.8e-84	698	5.0e-86	444	2.3e-79	697	2.2e-77

B

A. nidulans



S. cerevisiae

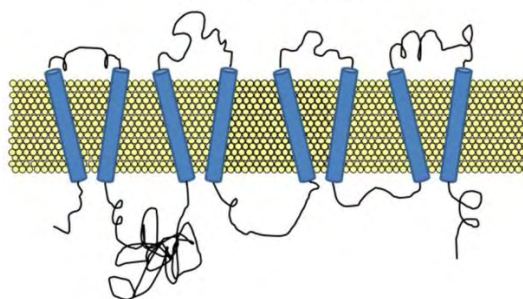


Figura R22: A) Resultados de la búsqueda de proteínas similares a los transportadores Trk de *S. cerevisiae* y *S. pombe* en *A. nidulans*. B) Predicción de la estructura de los Trks encontrados en *A. nidulans* y estructura propuesta para los canales Trk-HKT de *S. cerevisiae*.

Las predicciones se muestran en la (figura R22 panel B) y coinciden en asignar ocho dominios transmembrana a cada transportador. Además todos los transportadores presentan en uno de sus dominios transmembrana posición carboxilo terminal, el 7° o el 8°, una “secuencia firma” del canal de potasio. Esta secuencia es común a todos los canales de potasio y se compone de tres residuos consecutivos de glicina, tirosina y glicina (GYG), que por sus características físico-químicas confieren la especificidad del poro por los iones potasio discriminando estos de cationes con un volumen atómico similar y dando lugar a que estos iones pasen deshidratados a través del poro de forma, circunstancias que aumentan la selectividad del canal [123].

4.9.2 Análisis de la expresión de los transportadores Trks

Puesto que estos transportadores Trk se encargan del transporte de potasio a través de la membrana plasmática, se analizó la expresión de los tres transportadores encontrados en *Aspergillus* en diferentes concentraciones de potasio en el medio. Además se estudió la influencia de la proteína HalA en los niveles de transcripción de estos transportadores, usando la técnica de “Northern-blot” descrita en el apartado 3.4.6 de materiales y métodos.

El patrón de expresión encontrado fue diferente para cada transportador Trk. Mientras que la expresión de *trkA* era dependiente de la concentración externa de K^+ , *trkB* y *trkC* codifican transportadores de potasio que se expresan de forma constitutiva (figura R23). En condiciones de crecimiento con elevadas concentraciones de potasio, la expresión de *trkA* es mucho menor que cuando el medio de crecimiento presenta unas concentraciones bajas (trazas) de potasio. En la cepa *halA*⁻ la regulación transcripcional de *trkB* y *trkC* es constitutiva al igual que en la cepa silvestre, pero la expresión de *trkA* no está reprimida por la presencia de altos niveles de K^+ en el medio.

También se analizó el papel del regulador transcripcional SltA que media la respuesta a estrés salino en *Aspergillus nidulans*. Se analizaron los niveles de transcripción en una cepa mutante *sltA1* sin que se observasen diferencias significativas en la expresión de los tres genes *trk* respecto a la cepa silvestre. El hecho de que la cepa doble mutante *halA⁻ sltA⁻* muestre un patrón de expresión de *trkA* similar al que muestra la cepa *halA⁻* sugiere que el mecanismo regulador en el que participa HalA es independiente de SltA.

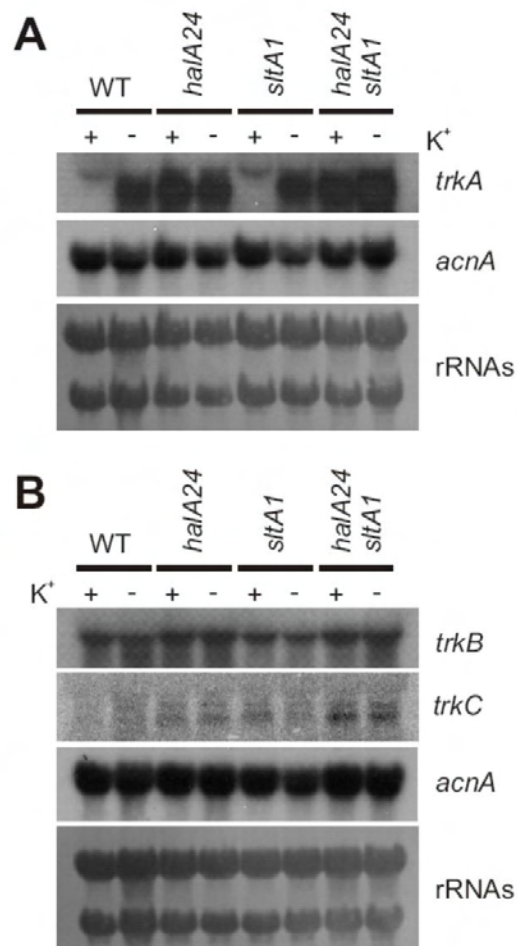


Figura R23: Patrón de expresión de los distintos transportadores de potasio de *A. nidulans*. En el panel A se muestran los niveles estacionarios de mRNA detectados para *trkA* y en el panel B para los genes *trkB* y *trkC*. Como control de carga de RNA total, en ambos paneles se muestran imágenes de los RNAs ribosomales mayoritarios (rRNAs) y de los niveles de transcripción de la actina, gen *acnA*.

Los datos de los niveles de expresión de *trkA* en el fondo silvestre y mutante *halA24* indican que los niveles intracelulares de K^+ han de ser medidos para dar lugar a la síntesis de TrkA en condiciones de bajo potasio. Como primera hipótesis, esta observación implicaría la presencia de un sistema regulador por K^+ sobre el que HalA, opcionalmente, podría actuar. Alternativamente, sería posible que los niveles de K^+ intracelular se viesen reducidos dado que HalA actuaría durante su localización próxima a la membrana plasmática como un activador de los canales de K^+ .

Para analizar esta posibilidad se introdujeron mediante transformación copias extra de *trkA* utilizando un plásmido autorreplicativo. También se generaron cepas con copias extra de *halA*. Estas cepas, junto con otra que portaba el plásmido autorreplicativo vacío, se crecieron en medios con 0,1 M KCl, 1 M KCl, 0,3 M LiCl, MMA- K^+ y 1 M KH_2PO_4 . Contrariamente al efecto supresor de la introducción de copias extra de *halA*, las copias extra de *trkA* no prevenían del efecto inhibitorio del crecimiento causado por los bajos niveles de K^+ en la cepa *halA*⁻ (figura R24). Sin embargo se observó un efecto mínimo por la expresión de *trkA* en condiciones de baja concentración de potasio donde el radio de crecimiento del mutante HalA24 aumenta. Todos estos datos sugieren que la funcionalidad de los transportadores Trk puede estar reducida en la ausencia de esta quinasa causando una deficiencia en los niveles intracelulares de K^+ .

4.9.3 Construcción de cepas nulas para los distintos transportadores.

Para profundizar en el estudio de la regulación de los transportadores de potasio por HalA se construyeron las cepas nulas para cada uno de los genes *trk*. Para ello se

siguió el protocolo descrito en el apartado 3.2.4.1 de esta tesis y fue llevado a cabo por diferentes componentes del grupo.

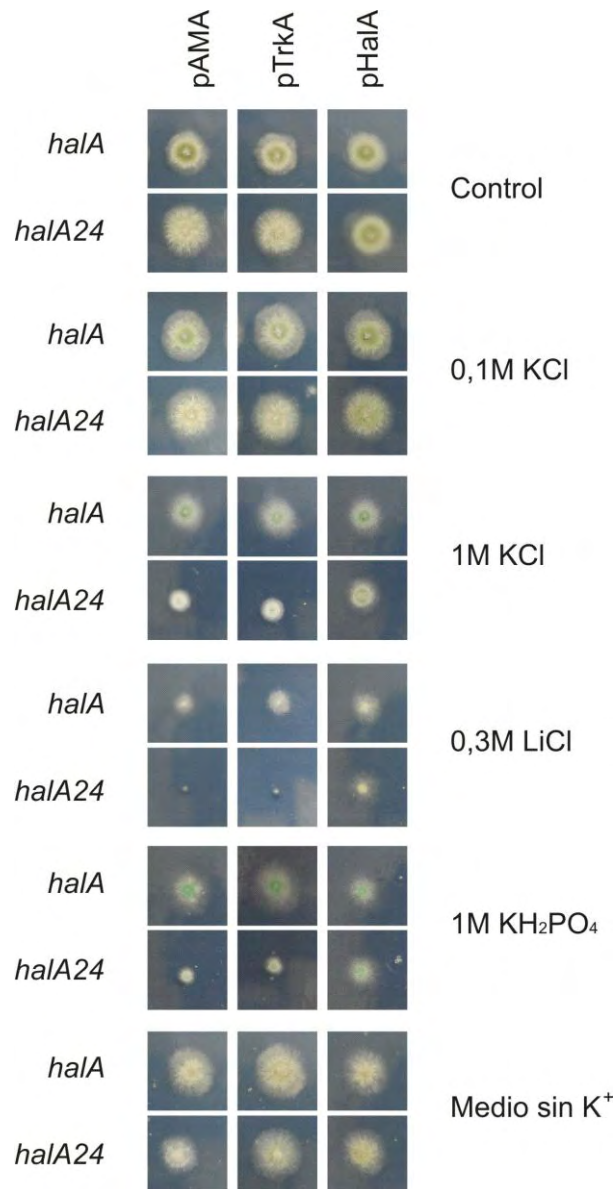


Figura R24: Crecimiento de las cepas que sobreexpresan el plásmido vector (pAMA), TrkA (pTrkA) y HalA (pHalA) en MMA suplementado con diferentes cationes.

La cepa $\Delta trkA$ fue construida por la Dra. Helen Findon en el Imperial College de Londres y la cepa $\Delta trkB$ fue construida por Ane Marquina en este laboratorio. Para la construcción de la cepa nula de *trkC* se amplificó la región correspondiente al promotor de *trkC* con los oligonucleótidos PP1trkC y PP2trkC, la región correspondiente al terminador de *trkC* se amplificó con los oligonucleótidos GSP3trkC y GSP4trkC, y el

gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus* se amplificó con los oligonucleótidos SMP1trkC y GFP2trkC, utilizando como molde el plásmido 1439. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, PP1trkC y GSP4trkC.

Ese fragmento se transformó en la cepa MAD1739 siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.2 de Materiales y Métodos. Para verificar que los transformantes habían incorporado de forma correcta el fragmento construido en su genoma se analizaron utilizando la técnica de “Southern Blot” descrita en el apartado de materiales y métodos. Se generaron las cepas nulas y se verificó que ninguno de estos genes por separado son genes esenciales en *A. nidulans*. También se comprobó que en MMA estándar las cepas nulas no muestran un fenotipo apreciable (figura R25, control)

4.9.4 Mantenimiento del potencial de membrana, papel de HalA y TrkB.

Además de analizar el papel de HalA en la regulación transcripcional y post-transcripcional de los transportadores de potasio, se estudió el papel de esta proteína en el mantenimiento del potencial de membrana. Para ello se analizó la sensibilidad de las cepas *halA*⁻ tanto al mono- como al tetrametil-amonio (TMA). Ambas formas de metilamonio son responsables de despolarizar la membrana plasmática ya que introducen cargas positivas en el interior celular (figura R25 panel A). En el caso de mono-metilamonio se observó una gran sensibilidad de todas las cepas a concentración de 20mM, pero se inhibe sobre todo el crecimiento de cepas *halA*⁻. Respecto a la sensibilidad al TMA, como ya se ha descrito en *S. pombe* [93] se precisan elevadas concentraciones de TMA para observar inhibición del crecimiento. Mientras que la cepa silvestre presentó una resistencia moderada frente a 0,6M TMA se observó una elevada sensibilidad de los mutantes *halA*⁻ a concentraciones de 0,4M TMA (figura R25B).

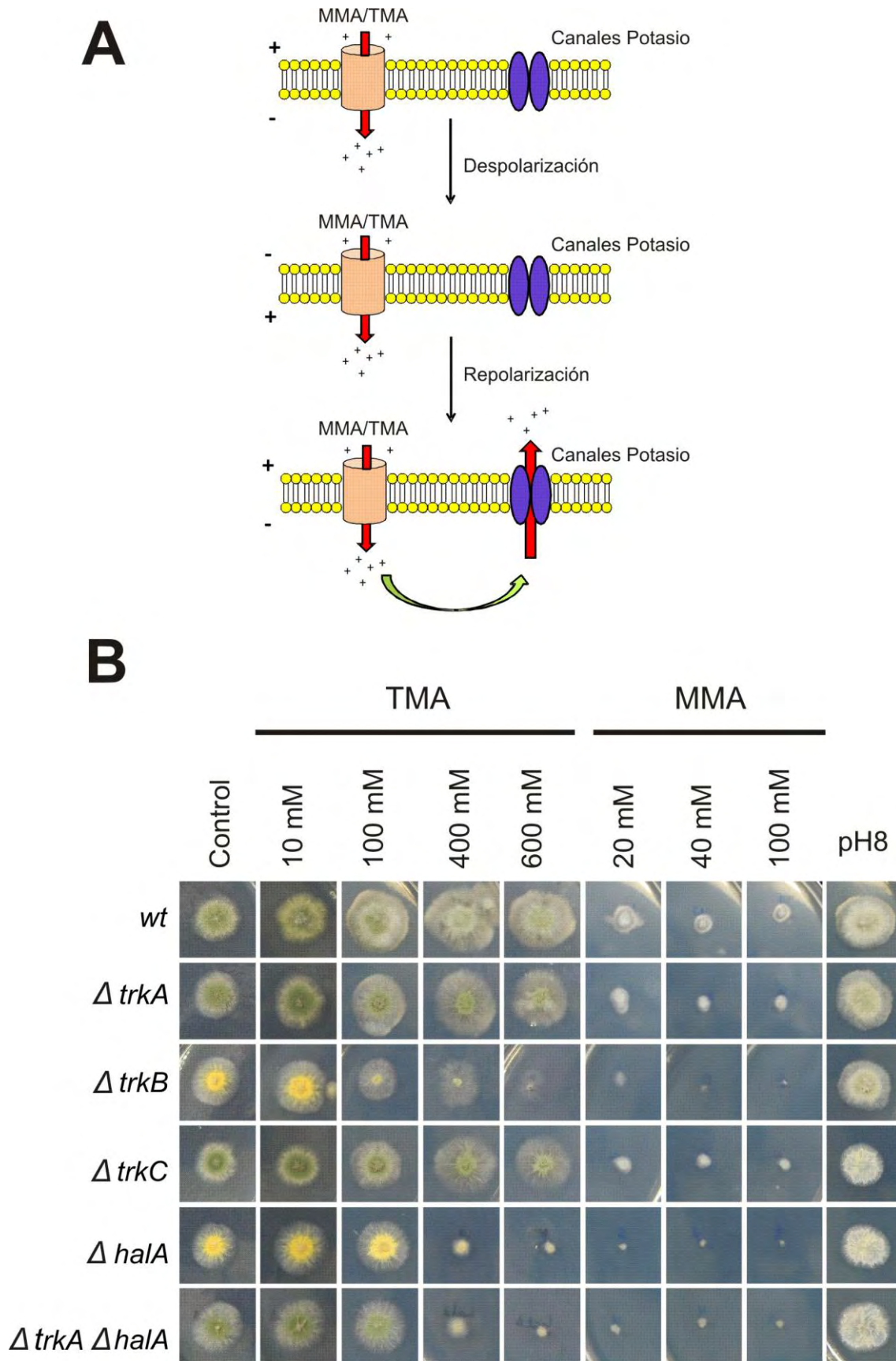


Figura R25: A) Esquema del mecanismo de acción del metilamonio. B) Crecimiento de las diferentes cepas carentes de alguno de los transportadores de potasio o de la proteína HalA en distintas concentraciones de mono (MMA) y tetrametil amonio (TMA) así como a pH 8.

Respecto al papel de los transportadores de potasio Trk en la polarización de la membrana, las cepas nulas de *trkA* y *trkC* mostraron un fenotipo semejante al de la cepa silvestre tanto en mono como tetrametilamonio, mientras que la cepa $\Delta trkB$ mostró una sensibilidad al TMA similar a la que se observó con las cepas *halA*⁻. Paralelamente se analizó el crecimiento de todas las cepas en un medio de pH alcalino (pH=8 usando Na₂HPO₄), para asegurar que la posible alcalinización del medio causada por los elevados niveles de TMA no fuera la causa de la inhibición del crecimiento mostrada por la cepa nula de *trkB* y cepas *halA*⁻ (figura R25 panel B). Los mutantes nulos *trk* no evidenciaron sensibilidad al pH alcalino.

Estos resultados sugieren que HalA se necesita para el mantenimiento del potencial de membrana y que en esta función debe de estar ayudada por la actividad de TrkB, sugiriendo una posible acción de la quinasa HalA en la activación de este transportador iónico.

4.9.5 Papel de los transportadores Trks en la respuesta a estrés catiónico.

Para analizar la implicación de los Trks y de la proteína HalA en la homeostasis de cationes en primer lugar se analizó el crecimiento de cepas nulas en estas proteínas en MMA con bajo potasio (MMA-K⁺) y con la adición de elevadas concentraciones de diferentes cationes: K⁺, Na⁺ y Li⁺ (figura R26). De acuerdo con las observaciones previas (figura R14) *halA* se requiere a bajas concentraciones de K⁺. Observamos el mismo fenotipo de inhibición del crecimiento tanto en la cepa $\Delta trkA$ como en la $\Delta trkB$, mejorando el crecimiento con la adición al medio de 10 mM de KCl. Estos resultados sugieren un papel de *halA* en la activación de ambos sistemas de transporte.

Así como ya se ha determinado la sensibilidad a Li de las cepas *halA*⁻, se observó en este caso, la completa inhibición del crecimiento de la cepa nula *trkB*, pero no de las cepas nulas *trkA* y *trkC* (figura R26). El litio es un análogo del sodio y este catión resulta tóxico para estas cepas posiblemente porque se ha observado como el transporte de sodio en cepas carentes de la proteína quinasa HalA es deficiente.

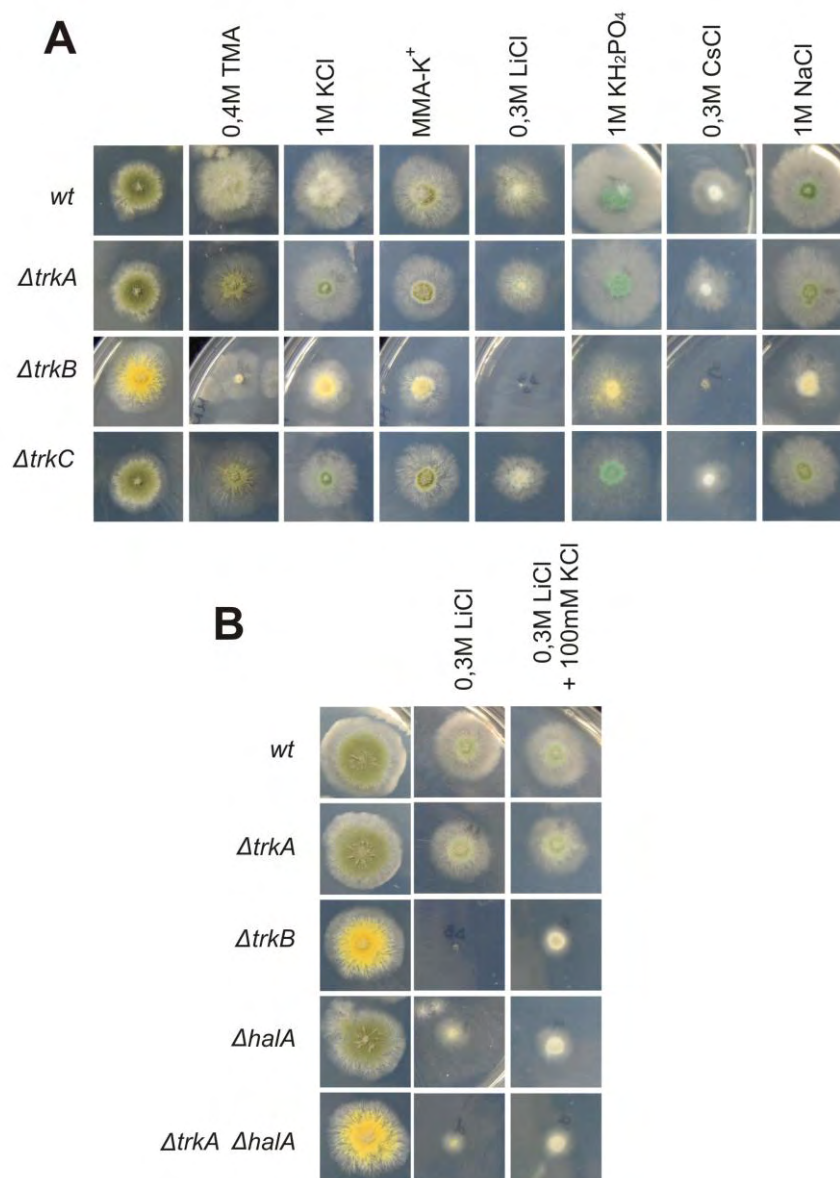


Figura R26: A) Crecimiento de las cepas nulas de los diferentes transportadores de potasio en MMA suplementado con distintos cationes. B) Crecimiento de las cepas en MMA suplementado con litio y con litio y potasio a la vez.

Cuando a este medio con litio se le añadió potasio en una concentración 100mM la cepa nula *trkB* redujo su sensibilidad al litio (figura R26). El experimento sugiere que esos niveles de K^+ extra son capaces de suprimir la ausencia de TrkB hasta un cierto punto, a un estado similar al que se observa con la ausencia de HalA. Sin embargo, la ausencia de HalA no puede ser suprimida por el exceso de K^+ , lo que indicaría que ese K^+ no está entrando o compitiendo en su entrada con el Li^+ , si ese fuera el sistema de detoxificación.

También se analizó el comportamiento de las diferentes cepas nulas de los diferentes transportadores de potasio Trks en MMA suplementado con diferentes cationes. Solo se observó un crecimiento diferente al crecimiento de la cepa silvestre en la cepa nula *trkB*, lo que indica que TrkB parece ser un transportador de potasio necesario para la regulación de homeostasis de cationes en *A. nidulans*.

4.9.6 Localización subcelular de TrkB.

Los anteriores experimentos muestran que TrkB sería el principal implicado en la regulación de la homeostasis de cationes. Para poder analizar en profundidad el papel de este transportador se decidió estudiar su localización subcelular. Para ello se realizaron experimentos de fraccionamiento al igual que se hizo para el estudio de localización de la quinasa HalA.

Para realizar este estudio se construyó un fragmento mediante PCR que incluía a TrkB unido a tres copias del epítipo Myc que serviría para localizar esta proteína gracias a un anticuerpo específico. Para ello se usaron los oligonucleótidos GSPTrkB1-4 y GFP1,2. A continuación se transformaron con este fragmento las cepas MAD1739 y MAD1124 siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.2. De esta forma se podría comparar la localización del transportador de potasio en presencia (MAD1739) y en

ausencia (MAD1124) de la proteína quinasa de interés, HalA. Para verificar que el fragmento se había integrado correctamente se analizaron los transformantes utilizando el método de Southern blot descrito en el apartado 3.4.5. Mediante esta técnica se comprobó como todos los transformantes de la cepa MAD1739 habían integrado el fragmento, pero no lo habían hecho los transformantes de la cepa MAD1124.

Para estudiar la localización de TrkB en el fondo genético *halA24* se generó la cepa correspondiente (MAD3210) mediante el cruce de las cepas TrkB::Myc (MAD3240) y la cepa *halA24* (MAD1124), siguiendo el protocolo del apartado 3.3.4. A continuación se realizaron experimentos de fraccionamiento para visualizar TrkB en el fondo silvestre y mutante *halA24* utilizando las cepas anteriormente citadas. Además se incluyeron en los experimentos condiciones de elevada y baja concentración de potasio para poder analizar posibles cambios de localización del transportador dependientes de K^+ (figura R27).

La figura R27, panel A, muestra que en el fondo *halA* silvestre (WT) TrkB se detecta en las fracciones P0,3K y P13K tanto en condiciones de alta como de baja concentración de potasio. Por lo tanto TrkB muestra localización en la membrana plasmática y en grandes agregados y membranas de orgánulos intracelulares. Se midió la intensidad de las bandas detectadas en “western-blot” con anticuerpo α -Myc y se normalizó frente a la cantidad de proteína cargada, medida por tinción con Coomassie en el gel, y se encontraron diferencias entre las dos concentraciones de potasio. A una concentración extracelular baja de potasio la cantidad de TrkB detectada en la fracción que contiene la membrana plasmática (P0,3K) es superior a la que se detecta en la fracción de membranas intracelulares y orgánulos (en el experimento mostrado 126% frente a 82%, 1,5 veces mayor). En condiciones de cultivo de alto potasio la relación se

RESULTADOS

invierte y aunque TrkB se detecta de nuevo en ambas fracciones, esta vez se detecta más en la fracción membranosa intracelular que en la que contiene la membrana plasmática (77% frente a 122%). Estos datos sugieren la existencia de un mecanismo regulatorio dependiente de potasio en la localización del transportador en la membrana.

La ausencia de HalA determina cambios en la localización de TrkB. En condiciones de baja concentración de potasio en un fondo *halA24* TrkB tiende a acumularse menos en la fracción correspondiente a la membrana plasmática comparado con la fracción de membranas intracelulares, y lo contrario ocurre en condiciones de alto potasio.

Estos cambios de localización de TrkB se confirmaron mediante microscopía de fluorescencia. Para ello se construyeron cepas que expresaban TrkB fusionado a GFP. Se siguió la misma estrategia que para otros etiquetados, generando un fragmento que contenía a *trkB* fusionado al gen codificante de la proteína fluorescente verde, transformando en este caso las cepas MAD1739 y MAD1124. Estas cepas fueron construidas por Ane Marquina en el laboratorio siguiendo los protocolos descritos anteriormente en este mismo apartado. En primer lugar se puede observar como en la cepa silvestre para la proteína HalA, el transportador de potasio TrkB se localiza a lo largo de toda la hifa. Parte de la fluorescencia aparece en el citoplasma y parte en la membrana plasmática de forma irregular. Cuando en el medio extracelular existe una baja concentración de potasio, el transportador tiende a localizarse en mayor medida en la membrana plasmática y en pequeños agregados a lo largo de la hifa (figura R28 panel A), pero sigue estando presente también en el citoplasma aunque en menor medida. Cuando la concentración de potasio en el medio extracelular aumenta, la distribución del transportador tiende a ser más citoplasmática que localizada en la membrana.

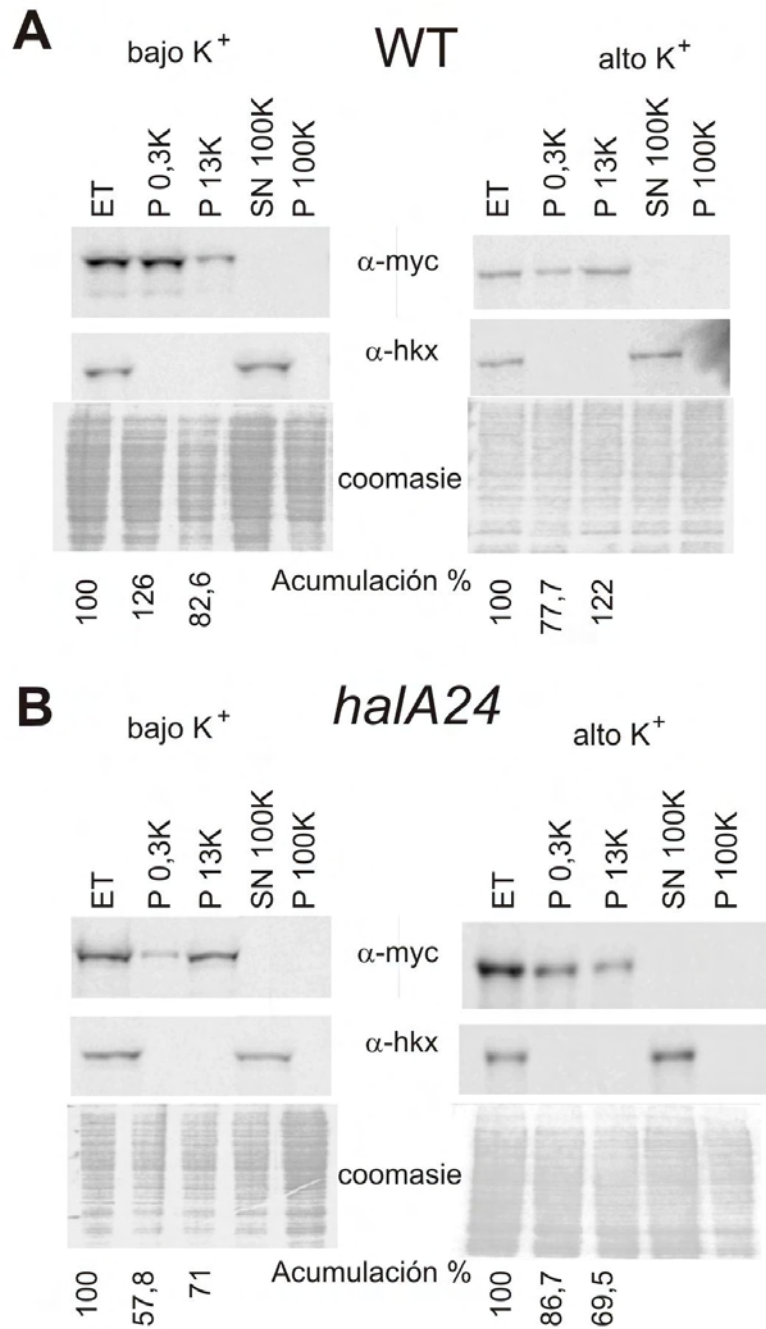


Figura R27: Fraccionamiento celular. A) Cepa silvestre MAD 1739 en medio sin potasio (bajo potasio) y con una concentración de 100mM de potasio (alto potasio). B) Crecimiento en las mismas condiciones que la anterior de la cepa portadora de la mutación *halA24*, MAD1124. También se realizaron geles teñidos con coomassie, para verificar la igualdad en las cargas de cada uno de los extractos utilizados. De esta forma se aseguró que las diferencias observadas entre extractos se debían a diferencias en la localización de la proteína y no por diferencias en la cantidad de proteínas cargadas. Se determinó la relación entre la intensidad de la banda detectada en cada fracción y experimento frente a los niveles de proteína cargados (medidos por la intensidad de tinción con Coomassie).

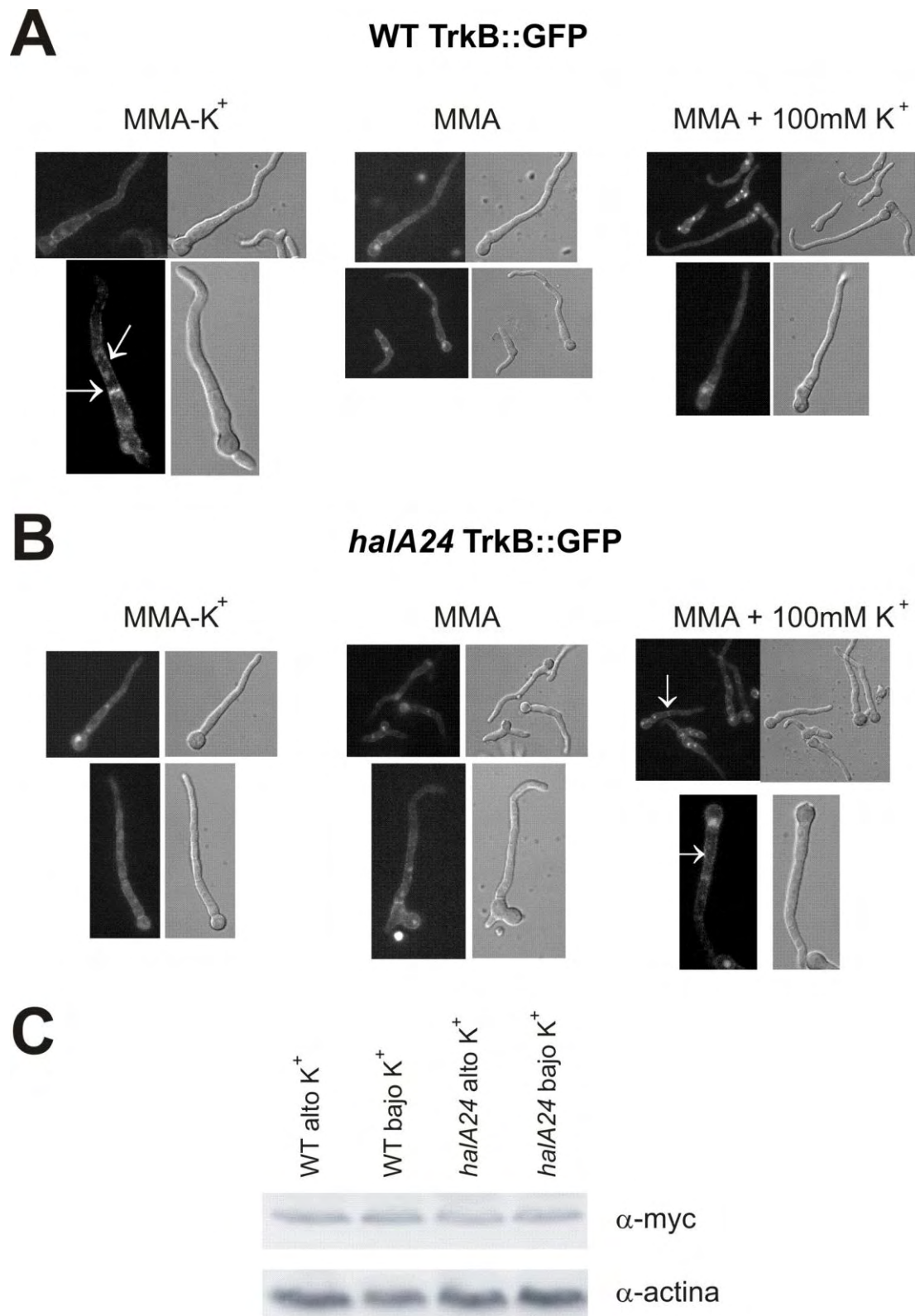


Figura R28: Microscopía de flourescencia para analizar la localización subcelular de TrkB en la cepa silvestre (A) y en la mutante HalA24 (B). (C) Estudio por “western blot” de la expresión de TrkB en distintas condiciones de cultivo. Las flechas blancas en A y B señalan las zonas de acumulación de TrkB (membrana celular v septos).

Además se observa que no existe una acumulación de TrkB en el ápice de la hifa en contra de lo esperado, al ser esta parte de la célula más rica en ergosterol [124] y por tanto favorecer la acumulación de transportadores de membrana en los denominados “lipid rafts”. A pesar de que la endocitosis y exocitosis están polarizadas [125,126] no se observa acumulación de TrkB en el ápice de la célula. De hecho, TrkB parece ausente de la región más apical y se observa en las zonas más maduras de la hifa.

Cuando analizamos lo que ocurre con la localización del transportador TrkB en una cepa portadora de la mutación *halA24* observamos como ocurre justamente lo contrario a lo observado en una cepa silvestre de HalA (figura R28 panel B). Cuando en el medio extracelular la concentración de potasio es baja, la distribución del transportador es mayoritariamente citoplasmática, mientras que cuando la concentración aumenta, TrkB tiende a localizarse en la membrana plasmática y en pequeños agregados a lo largo de la hifa. También en esta cepa mutante *hal24* observamos que no existe una acumulación en la parte apical de la hifa. Los resultados observados en la distribución del transportador TrkB gracias a la microscopía de fluorescencia están en concordancia con los obtenidos utilizando la técnica del fraccionamiento celular (figura R27)

Finalmente se analizó mediante la técnica de “western-blot” descrita en el apartado 3.4.2 los niveles de proteína presentes en cada una de las condiciones (figura 28 panel C). Se observó que no existían cambios post transduccionales en ninguna de las condiciones. Este hecho no demuestra que TrkB no sea un sustrato fosforilable por HalA, sin embargo los resultados obtenidos por el grupo del Profesor Herb Arst de Londres apoyan esta posibilidad (ver Discusión).

DISCUSIÓN



5.- DISCUSIÓN

Durante el trabajo experimental realizado en esta tesis doctoral se han identificado y caracterizado algunos de los componentes de los procesos de señalización y respuesta implicados en la homeostasis y resistencia a cationes, principalmente de sodio y potasio, del hongo *Aspergillus nidulans*. Se ha determinado el papel de la proteína quinasa HalA en ambos procesos mencionados previamente y se han identificado TrkA, TrkB y TrkC, tres transportadores de potasio de la membrana plasmática del hongo, estudiándose su función en el hongo. Además se ha establecido el papel que desempeña HalA en la regulación de estos transportadores de membrana, actuando esta quinasa a dos niveles diferentes: mediante la modulación de la expresión del transportador TrkA y definiendo la localización subcelular del transportador TrkB.

1.- HalA es un factor importante en la respuesta a estrés catiónico.

En comparación con el trabajo realizado en levaduras, especialmente en *S. cerevisiae* [32,127,128], los mecanismos que gobiernan la homeostasis de cationes y la respuesta adaptativa al estrés salino están muy poco estudiados en los hongos filamentosos. Las quinasas Hal4 y Hal5 participan tanto en el proceso de halotolerancia en *S. cerevisiae* (en la discusión se añadirá a cada proteína las iniciales de la especie citada para facilitar así la comprensión del texto, ScHal4 y ScHal5) como en la asimilación de determinadas fuentes de nitrógeno [32,92]. Utilizando *A. nidulans*, hemos determinado que la quinasa HalA es homóloga a las quinasas ScHal4 y ScHal5, ya que se precisa para la resistencia a elevadas concentraciones de cationes monovalentes en el medio extracelular. Cationes monovalentes como el Na⁺, K⁺, Li⁺, Cs⁺ y TMA son tóxicos, a partir de ciertas concentraciones, para una cepa deficiente

para HalA, sin embargo esta quinasa no se requiere para la resistencia a elevadas concentraciones de cationes divalentes. El papel de HalA parece ser aún más complejo, dado que también se necesita a esta quinasa el correcto crecimiento del hongo en medios con bajas concentraciones de potasio.

Las proteínas ScHal4 y ScHal5 poseen una función redundante [127]. En el genoma de *A. nidulans* hemos identificado un gen que codificaría para un posible ortólogo de estas quinasas, el locus AN2943. La función de la proteína codificada por este gen no se ha estudiado en esta tesis doctoral, sin embargo los datos obtenidos en este trabajo permiten concluir que en el caso de *A. nidulans* HalA media las funciones realizadas por la dos quinasas Hal de *S. cerevisiae*. Sin embargo, HalA no posee el papel asignado a ScHal4 y ScHal5 intervienen en el metabolismo del nitrógeno modulando la localización subcelular de determinados transportadores de aminoácidos tales como la permeasa de arginina, la permeasa de uracilo o el transportador de glucosa [92], derivada posiblemente de su relación con la familia de quinasas NPR. Es especulativo, pero posible que la putativa quinasa AN2943 podría participar de forma específica en este proceso de regulación del metabolismo del nitrógeno, no obstante pese al enorme trabajo genético realizado por numerosos grupos en el estudio de la asimilación del nitrógeno, no se han obtenido mutantes en dicho *locus* [129,130].

Estudios de nuestro grupo demuestran la existencia de una relación genética entre HalA y el factor transcripcional SltA sobre la homeostasis del catión divalente calcio. La cepa doblemente nula *halA sltA* muestra un elevado requerimiento de calcio, aproximadamente de 10mM Ca²⁺ en el medio para una completa supresión del fenotipo [94]. Este requerimiento de calcio puede acentuarse si en el medio extracelular se eleva la concentración de sodio o de potasio [50]. El doble mutante nulo *halA sltA* muestra

además hipertrofia vacuolar observándose un incremento en el número y el tamaño de las vacuolas, las cuales pueden llegar a acumularse incluso en la zona más apical de la célula, situación que no es habitual en las silvestres [50]. Para explicar este requerimiento excesivo de calcio, también denominado “auxotrofia de calcio”, se ha hipotetizado un excesivo e inadecuado almacenamiento de este catión en el interior celular debido al gran contenido vacuolar del mutante (figura D1). Aunque no se ha podido determinar la concentración de calcio en vacuolas, se ha demostrado el papel de dicho orgánulo en la homeostasis de calcio en *A. nidulans* mediante el estudio de la actividad de la ATPasas de calcio vacuolares PmcA y PmcB. En cepas nulas *halA sltA*, los niveles transcripcionales de *pmcA* y *pmcB* están elevados seis y doce veces respectivamente [50], mostrando así el papel concertado de la quinasa HalA y el factor transcripcional SltA en la regulación de los transportadores vacuolares de calcio. El cuádruple mutante nulo *halA, sltA, pmcA, pmcB*, no muestra el fenotipo de “auxotrofia de calcio”, aunque muestra hipersensibilidad a concentraciones altas o moderadas de otros cationes. Estos resultados avalan la hipótesis anterior.

Además de la excesiva vacuolización y acumulación intracelular de calcio se debe sumar el efecto de HalA sobre el transporte intracelular de calcio. En un mutante *sltA*⁻ el transporte de calcio no está regulado. El transporte de calcio radiactivo en un mutante *sltA*⁻ no es competido por la adición de calcio “frío”, como ocurre en la cepa silvestre. La ausencia de la quinasa HalA en el fondo *sltA*⁻ restaura la cinética de transporte de Ca²⁺ a los de la cepa silvestre. Este papel de HalA podría ser directo sobre un determinado transportador de calcio, o un conjunto de ellos, o indirecto a través del efecto de la ausencia de *halA* en el potencial de membrana, que alteraría la capacidad de apertura de ciertos canales activados por carga, como el heterodímero Mid/Cch.

DISCUSIÓN

En resumen, la quinasa HalA se precisa para la correcta respuesta a altos y bajos niveles de cationes monovalentes teniendo, además, un efecto menor o posiblemente indirecto en la homeostasis del calcio. Esta función contrasta con la descrita para ortólogos de esta quinasa en otros hongos.

De nuevo experimentos de genética clásica han proporcionado resultados tras los experimentos de supresión del fenotipo de auxotrofía de calcio en el doble mutante *halA⁻ sltA⁻*. La caracterización de estos supresores mostró la presencia de mutaciones en dos de los transportadores de Na⁺ y K⁺ de este hongo. El posible antiportador de Na⁺/H⁺ NhaA y el posible transportador de K⁺, TrkB [50]. Se aislaron ocho mutaciones en el gen *nhaA*, homólogo de NHA1 y una en *trkB*. El fenotipo supresor de las mutaciones en *nhaA* se debían a pérdidas de función en este transportador, como se verificó mediante la construcción del triple mutante nulo *halA; sltA; nhaA*. Sin embargo, la mutación *trkB1* no debía de representar una pérdida de función de este transportador de potasio dado que el alelo nulo *trkB*, generado por genética en reverso, no suprimió la auxotrofía de calcio del doble mutante nulo *halA; sltA*.

En el alelo *trkB1*, el residuo de serina 373 es substituido por un residuo de leucina, Ser372Leu. En las predicciones HMMTOP, TrkB presenta ocho dominios transmembrana y la mutación Ser372 se localiza en un lazo muy conservado entre el segundo y el tercer dominio transmembrana. Este residuo conservado de serina podría ser una diana de fosforilación, la cual tendría un papel regulador al modular negativamente la actividad de este transportador. Esta hipótesis se fundamenta en los resultados obtenidos de la selección de mutantes supresores de la auxotrofía de calcio anteriormente mencionada y por la evidencia del papel regulador de la fosforilación obtenidos por Yenush y colaboradores en 2005 en Trk1p [131]. Estos investigadores

observaron una interacción fisiológica en *S. cerevisiae* entre Trk1p y la fosfatasa Ppz1p y han demostrado la existencia de estados fosforilados de Trk1p. Sin embargo, en el caso de TrkB no hemos podido detectar modificaciones en el patrón de migración de la banda detectada en geles de SDS-PAGE tanto en diferentes condiciones de estrés o en los fraccionamientos subcelulares. La presencia de HalA en la célula no cambia tampoco este patrón de detección, por lo tanto es una línea de interés para el laboratorio el determinar el papel de la fosforilación tanto en el sistema TRK como en la activación de otros elementos reguladores del sistema de respuesta a estrés salino u homeostático.

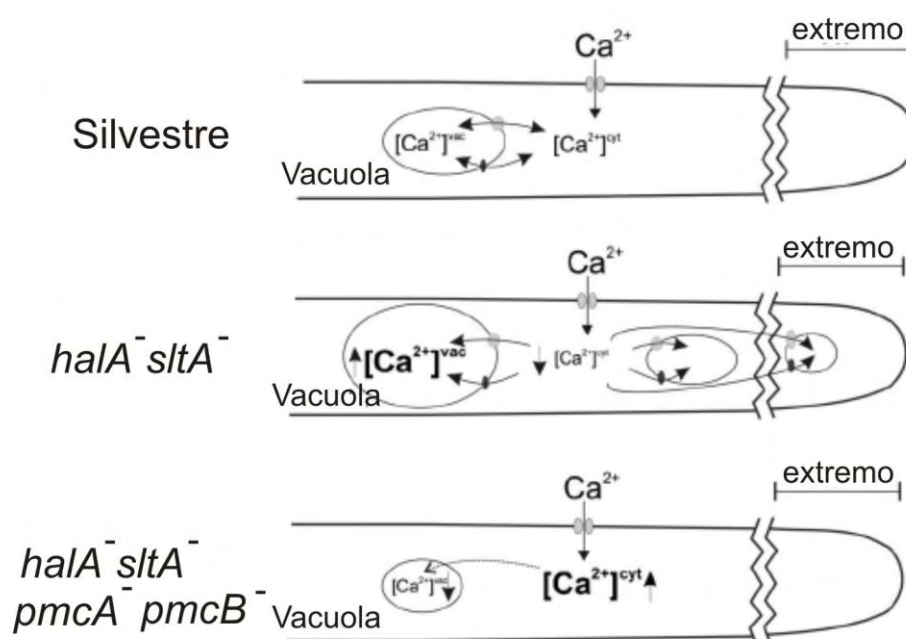


Figura D1: Mecanismo propuesto para el transporte de calcio al interior celular y su posterior almacenaje en la vacuola [50].

2.- HalA y el sistema de regulación a pH ambiental.

El proceso de obtención del mutante *halA24*, MoR24, establecía una relación funcional entre HalA y el sistema de pH ambiental. La mutación de pérdida de función

en *halA* suprime el fenotipo de sensibilidad al anión molibdato causado tanto por el fondo genético *pacC*^{+/-70001} y otros fondos mutantes en los que el sistema de señalización del pH ambiental está interrumpido, como en un mutante *palA1*. También se han observado supresión del fenotipo de utilización de GABA en un fondo mutante disfuncional de *AreA*, *areA*^r, el regulador del metabolismo de nitrógeno (Arst y Espeso, sin publicar), de forma similar al fenotipo que muestran los mutantes *pacC* de pérdida de función. Estos resultados sugerían una relación entre el sistema de pH ambiental y la función de la quinasa HalA. Sin embargo, como se describe en la sección de resultados, los fenotipos mostrados por el alelo *halA24* o el nulo *halA*, mostraban un rango de acción de HalA fuera del sistema regulador por pH ambiental. Los fenotipos de $\Delta halA$ no son congruentes ni con una pérdida total de la función PacC, como es la supresión de una mutación *areA*^r, ni con una ganancia extrema de su función, resistencia al molibdato, sensibilidad a neomicina o sensibilidad a pH ácido generado por altos niveles de fosfato en el medio, que iría mas allá de la mostrada por los alelos de ganancia de función en PacC, *pacC*^c. Además, la supresión de HalA no requiere de la función PacC, como muestra el hecho de que suprima al mutante *pacC*^{+/-70001} que carece de transporte nuclear.

En este trabajo se han establecido diferentes nexos entre HalA y los factores transcripcionales PacC y SltA. Se ha demostrado en el laboratorio que tanto SltA como PacC, se precisan para el crecimiento del hongo a pH alcalino [94,43]. HalA, sin embargo, no tiene una relación directa con la respuesta a la alcalinización del medio, dado que un mutante *halA*⁻ no incrementa la sensibilidad a pH o suprime los fenotipos causados por las mutaciones de pérdida de función en estos dos factores transcripcionales. En relación con otros sistemas, en *S. cerevisiae* no se ha establecido

ninguna relación entre las quinasas Hal4 y Hal5 y el homólogo de PacC, Rim101, y no existe homólogo de SltA en hongos levaduriformes. De hecho, el estudio transcriptómico de la respuesta a la alcalinización del pH ambiental en *S. cerevisiae* no ha mostrado a los genes *Hal4* o *Hal5* como dianas de respuesta [132], de hecho las cepas mutantes *hal4 hal5* no muestran afectado su crecimiento a pH alcalino [133].

La búsqueda de supresores del fenotipo de sensibilidad a molibdato causado por la mutación *pacC^{+/-70001}* proporcionó 17 cepas con mutaciones extragénicas a PacC. En ningún caso los componentes de la ruta de señalización Pal están afectados. De estos 17 mutantes 3 han sido caracterizados con un poco de más detalle y lo único que ha podido establecerse es que deben participar en el sistema de detoxificación del anión molibdato. En el caso de HalA (MoR24), dicha acción podría deberse a una modificación del transportador de molibdato mediante fosforilación, o quizás sea el resultado de la modificación del potencial de membrana o contenido catiónico intracelular. Se desconoce la identidad de los genes en los que residen las mutaciones MoR21 y MoR19. Debido a la localización de la mutación MoR19 en el cromosoma III se han revisado genes candidatos de los ya caracterizados en este trabajo y otros posibles candidatos relacionados con el transporte de molibdato, sin éxito alguno. Los mecanismos de resistencia a molibdato permanecen aún desconocidos, aunque el presente estudio evidencia un carácter poligénico de este proceso. La resistencia a molibdato requiere de al menos 3 genes/loci además de la ruta PacC. El futuro permitirá definir cuáles son y cuál es su relación con la señalización a pH ambiental.

En resumen, mutaciones en *halA* alteran el sistema de homeostasis de cationes y que este fenotipo puede repercutir en la respuesta normal del hongo al pH ambiental y a procesos asociados, como es el caso de la resistencia al ion molibdato. La actividad

HalA, hasta el momento, queda delimitada en la correcta regulación del circuito de homeostasis y respuesta a estrés salino, y su alteración causa efectos pleiotrópicos.

3.- Genética clásica *versus* genética en reverso para el estudio de la homeostasis de cationes.

En este estudio se han utilizado dos enfoques genéticos diferentes. La genética clásica ha permitido la identificación del gen *halA* y la relación genética entre la homeostasis de calcio y la de cationes monovalentes a través de *sltA*, *nhaA* y *trkB*. Debido al acceso generalizado a las bases de datos, una gran parte del trabajo se ha basado en la utilización de la genética en reverso. Ambos enfoques presentan ventajas e inconvenientes para el futuro de esta línea experimental.

En el caso de la genética en reverso somos capaces de identificar los genes de interés, pero obviamente, estos son buscados sobre una base de la conservación en función o similitud de secuencias. En algunos casos es muy posible que se obtenga una visión muy parcial del sistema, basada en elementos ya identificados en otros organismos con la consiguiente pérdida en la novedad en los resultados, pero puede que no encontremos los puntos importantes implicados en algunos procesos, ya que de alguna forma estamos dirigiendo la búsqueda hacia unos genes determinados. Utilizando la genética en reverso ha sido posible caracterizar en el laboratorio a los genes que codifican para CrzA [94], factor de transcripción implicado en la homeostasis de cationes, así como a los que codifican para las ATPasa de membrana PmaA y PmaB o a dos de los tres transportadores de potasio, TrkA y TrkC. La metodología habitual ha sido generar alelos nulos, reemplazando completamente la secuencia codificante por un marcador fácilmente seleccionable, lo que permite concluir con relativa facilidad cual es el fenotipo que causa la total ausencia de esta proteína en la célula. La posibilidad de

combinar los diferentes alelos nulos generados con otros alelos hipofuncionales en otros genes mediante técnicas de genética clásica permite establecer las relaciones de epistasia o hipostasias entre ellos. En esta memoria se ha recogido el trabajo realizado principalmente entre *halA* y los genes *trkA* y *trkC*. La identificación de AN2943, un gen que codifica una proteína de características semejantes a las proteínas quinasas del tipo Hal, es un próximo objetivo del laboratorio para determinar su implicación en la ruta de homeostasis de cationes en *A. nidulans*.

La genética clásica presenta como principal ventaja que nos ayuda a identificar genes cuyos productos son clave en la función celular que se está analizando. De esta forma se han identificado a *halA* [107], objeto principal de este trabajo, *sltA* [50,134], y a los transportadores de cationes *nhaA* y *trkB*. HalA constituye un ejemplo de un resultado inesperado a partir de un análisis genético clásico. Como ya se ha mencionado reiteradamente un mutante en *halA* se aisló durante la búsqueda de supresores del fenotipo de pérdida de localización nuclear del factor de transcripción PacC pero no participa en su señalización. Así mismo, las quinasas ScHal4 y ScHal5 fueron halladas en experimentos de supresión de fenotipos mediante sobreexpresión [77]. La genética clásica pone de manifiesto la relación entre el sistema de pH y la homeostasis de cationes y la existencia de fenotipos cruzados en mutantes ambas rutas o la existencia de efectos pleiotrópicos en determinadas mutaciones. Como ya se indica arriba, la genética clásica ayuda a posteriori a la mejor clasificación de los alelos mutantes encontrados y en delimitar el rango de acción de cada uno de ellos.

Nuevamente, un resultado interesante fue obtenido mediante la supresión del fenotipo del doble mutante *halA sltA* para la auxotrofia de calcio, permitiendo identificar los homólogos de *NHA1*, *nhaA*, y de *TRK1*, *trkB*. En este caso, la

identificación de estos transportadores fue determinada por métodos de búsqueda in silico [135]. En este caso, la genética formal revela un papel de la homeostasis de cationes monovalentes como el sodio y el potasio en la homeostasis del calcio. En el caso del transportador de sodio/protones NhaA, la pérdida de función de este transportador supone la supresión del fenotipo mutante *halA sltA*. La mutación aislada en el transportador de potasio TrkB es más interesante dado que posiblemente sea una ganancia de función y su futuro estudio en mayor detalle posiblemente ayudará a establecer las bases de la regulación de estos transportadores en *A. nidulans* y el papel de la fosforilación en dicho proceso. La relación entre el nivel de K^+ y el mantenimiento del nivel de Ca^{2+} intracelular parece ser un hecho en *A. nidulans*.

Este estudio nos ayudó además a tener en cuenta que si las utilizábamos por sí solas las técnicas de genética clásica podían llevarnos a error dependiendo de la zona del cromosoma en la que nos encontremos [107]. En la era de la secuenciación de genomas una forma rápida para identificar genes es utilizar las frecuencias de recombinación entre mutaciones. Este trabajo muestra las dificultades en la identificación de un gen próximo al centrómero, el gen *halA*. El mapeo genético de la mutación *halA24* determina que el gen mutante está localizado en el brazo derecho del cromosoma III de *Aspergillus nidulans* y muy próximo, 1.8 cM, al gen *phenA*. En primer lugar identificamos el gen *phenA* (situado a 59 kb del centrómero), y a continuación, utilizando la base de datos del genoma de *Aspergillus* y el análisis del fenotipo causado por la mutación *halA24*, intentamos identificar al gen *halA* en la proximidad del locus *phenA*, fracasando en nuestra búsqueda. Utilizando la técnica del “paseo cromosómico” finalmente pudimos identificar al gen que portaba la mutación *halA24* y determinar que la distancia física entre las mutaciones *phenA2* y *halA24* es de

más de 66 kb. Extendimos nuestra búsqueda a otros marcadores genéticos frecuentemente utilizados en *A. nidulans*. Hemos determinado la distancia física entre siete *loci* diferentes, caracterizando una mutación en cada *locus*, cuatro en el brazo derecho del cromosoma III y tres en el brazo derecho del cromosoma IV. Nuestro trabajo muestra que la frecuencia de recombinación entre mutaciones en genes próximos al centrómero se reduce considerablemente en *A. nidulans*. Hemos determinado que en la cercanía del centrómero 1 cM corresponde a aproximadamente 50 kb, mientras que esta relación se reduce a menos de 2 kb por cM a una distancia de 240 kb de los centrómeros [107]. Este resultado tiene implicaciones importantes en las búsquedas de genes de *Aspergillus* que estén situados en las regiones pericentroméricas basándose en los datos existentes de genética clásica. Además nos avisa sobre el posible exceso de trabajo que puede ocasionar el verificar la integridad de genes candidatos basándose en la clasificación realizada por la base de datos. Es necesario un apoyo mutuo entre la genética clásica y la genética en reverso para proporcionar resultados definitivos y comprensibles que permitan avanzar en la comprensión de los diferentes sistemas regulatorios del hongo. En ningún caso se puede minusvalorar un abordaje respecto al otro.

4.- Sistema quinasa-fosfatasa en la respuesta a estrés salino.

En todas las células eucariotas, la fosforilación reversible de proteínas es el principal mecanismo de regulación de importantes procesos que ocurren en el interior celular tales como el metabolismo, el transporte a través de membranas o la división celular. El estado de fosforilación de las proteínas que intervienen en estos procesos es el resultado del equilibrio existente entre la acción específica de las proteínas quinasa y

DISCUSIÓN

las proteínas fosfatasa que fosforilan, respectivamente, los residuos aminoacídicos (serina, treonina, tirosina o histidina) de dichas proteínas [136]. En *A. nidulans* se han identificado 28 genes que codifican subunidades fosfatasa [137].

En eucariotas existen tres tipos principales de proteínas fosfatasa, las Ser/Thr fosfatasas que desfosforilan residuos serina y treonina de proteínas, las Tyr fosfatasas que desfosforilan residuos tirosina, y las proteínas fosfatasas de especificidad dual, que son capaces de desfosforilar los tres tipos de residuos [136].

En cuanto a la implicación de estas fosfatasas en la regulación de la homeostasis salina, se sabe que células carentes de algunas Ser/Thr fosfatasas presentan hipertolerancia a sodio y litio [138]; esto es debido al incremento de la expresión del gen ENA1 que codifica una ATPasa de sodio [31]. Existen evidencias bioquímicas y genéticas que apuntan al hecho de que los transportadores de potasio Trk1 y Trk2, implicados en la homeostasis iónica estarían también regulados por las fosfatasas Ser/Thr [131]. Todas las funciones en las cuales intervienen proteínas fosfatasas Ser/Thr del tipo Ppz (proteínas que desfosforilan preferentemente la subunidad β de la fosforilasa quinasa) están reguladas por la subunidad proteica Hal3. El gen HAL3/SIS2 ha sido identificado como capaz de conferir tolerancia a altas concentraciones de cationes sodio y litio cuando se sobreexpresa en cepas silvestres, mientras que la falta de este gen incrementa la sensibilidad a sal [79]. La implicación de los mecanismos de fosforilación/desfosforilación en la regulación de la toma de potasio se descubrió a raíz de la identificación de Hal3 como modulador de la salida de sodio y litio y de la entrada de potasio [139]. Hal3 se identificó como regulador negativo de la fosfatasa Ppz1 [79], una proteína Ser/Thr fosfatasa conocida por su influencia en los mecanismos de tolerancia a sal [138]. Yenush y colaboradores demostraron como la pareja Hal3/Ppz1 [144]

está implicada en la correcta regulación de las concentraciones internas de potasio y la regulación del pH de forma dependiente de los canales Trk [78]. Recientemente se ha mostrado como Trk1 está presente en la membrana plasmática en unas estructuras denominadas balsas lipídicas [32] donde interactúan con Ppz1 y con Hal3 en una forma dependiente de pH, lo que podría indicar que la interacción Hal3-Ppz1 actuara como sensor intracelular de pH que modulara la homeostasis de potasio mediante la regulación de la actividad de Trk. No se ha observado aún la desfosforilación directa de Trk1 por Ppz1.

Para analizar el papel de las fosfatasa en *A. nidulans* Son y colaboradores en 2009 [137] llevaron a cabo una delección sistemática de todos estos genes. La delección de *bimG*, *pphA*, *nimT* y AN29024 resulta letal para el hongo. *nimT* y *bimG* son necesarios para la entrada y progresión, respectivamente, en el ciclo mitótico [140,141]. Además se piensa que *pphA* regula la morfogénesis de la hifa. La fosfatasa activada por calcio, calcineurina, ha sido clasificada como esencial hasta que recientemente un estudio ha demostrado que el nulo es viable aunque con un fenotipo de alteración morfológica muy severa. Se ha propuesto recientemente a esta fosfatasa como un elemento necesario para la transición del sistema de transporte Trk al estado de alta afinidad por potasio inducido por el estrés catiónico [142].

HalA es una proteína quinasa y por lo tanto estará implicada en este sistema reversible de fosforilación y desfosforilación. Una parte muy importante de nuestro estudio es analizar el posible sustrato de fosforilación de esta quinasa. Uno de los posibles candidatos a ser fosforilados es la misma proteína quinasa en un proceso de autofosforilación. En este estudio y con las técnicas empleadas no hemos sido capaces de detectar la existencia de una autofosforilación de la proteína HalA, lo que nos llevó a buscar otros posibles candidatos para ser fosforilados por la quinasa. Otra posibilidad

DISCUSIÓN

sería que HalA fosforilara a su vez a otra proteína quinasa, participando así en una cascada señalizadora de quinasas. En esta opción debemos tener en cuenta al gen previamente identificado, AN2943, similar a una quinasa, que podría estar implicado en la ruta de homeostasis de cationes y ser el sustrato de fosforilación de la quinasa HalA. Esta posibilidad abre una futura línea de investigación en el laboratorio a la hora de esclarecer la ruta de señalización de la resistencia a elevadas concentraciones de cationes monovalentes en *A. nidulans*. En otros organismos, más concretamente en las levaduras *S. cerevisiae* o *S. pombe* se ha visto como las quinasas Hal4/Hal5 están fosforilando transportadores de potasio de membrana denominados Trks [92]. En nuestro caso nos planteamos si los transportadores de potasio son el sustrato de la proteína quinasa HalA.

Para analizar la implicación de HalA en la modulación de los transportadores Trk se estudió en primer lugar la localización subcelular de la quinasa. Para ello usamos en primer lugar la microscopía de fluorescencia para estudiar su ubicación. Marcamos la proteína con un epítipo fluorescente que somos capaces de detectar por su emisión al ser excitado con una determinada longitud de onda. Con esta técnica no fuimos capaces de ver diferencias en la localización de la quinasa dependientes de la concentración extracelular de potasio. Pese a ello decidimos realizar otro tipo de experimento para analizar su localización subcelular. En segundo lugar utilizamos el fraccionamiento celular y con el fuimos capaces de detectar un cambio de localización de la proteína que no éramos capaces de ver con la microscopía de fluorescencia. Esta técnica de microscopía normalmente nos permite estudiar la diferente localización subcelular de distintas proteínas, como por ejemplo el factor de transcripción CrzA, cuya localización pasa a ser nuclear en presencia de calcio en el medio extracelular [94]. Aún así hemos de ser cuidadosos a la hora de elegir las técnicas y a la hora de realizar conclusiones, ya [146]

que en el caso de HalA hemos necesitado utilizar dos técnicas diferentes para poder conocer la localización de la proteína en función de la concentración de potasio extracelular. Cuando existe potasio en el medio extracelular la proteína se localiza parte en la membrana plasmática y parte en el citoplasma, mientras que cuando el potasio se vuelve limitante en el exterior celular la proteína se localiza principalmente en la membrana plasmática de la célula.

5.- Sistema de transporte de potasio en *A. nidulans*.

HalA se localiza a dos niveles diferentes, en la membrana plasmática y en el citoplasma. Esta proteína presenta 2 poblaciones diferentes que pueden estar llevando a cabo funciones distintas dentro de la célula. Por un lado puede estar modulando el transporte de cationes a través de la membrana plasmática y por otro lado regulando el almacenamiento de cationes en orgánulos intracelulares. Se conoce como el hongo almacena cationes en el interior de sus orgánulos celulares para ayudar al mantenimiento del equilibrio catiónico celular [50]. Además hemos podido comprobar cómo esta localización a dos niveles del sistema de transporte de potasio es uniforme a lo largo de toda la hifa.

Los canales Trk son factores clave en el transporte de potasio [32]. Frente a los dos transportadores encontrados en las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*, en el genoma de *A. nidulans* se han identificado tres posibles transportadores de la familia Trk. La presencia de un transportador adicional sugiere la existencia de un sistema más complejo de transporte de potasio. TrkA y TrkB se han propuesto como los posibles homólogos funcionales de Trk1, mientras que TrkC lo sería de Trk2 [50]. Teniendo en cuenta la comparativa de secuencias que hemos llevado a cabo no podemos confirmar

que exista esa correlación ya que según sus secuencias TrkB es el más parecido a todos los Trk de otros organismos, a continuación TrkA es el que más se parece al resto de Trk y por último TrkC es el menos parecido a todos ellos. En la bibliografía encontramos como la principal diferencia entre scTrk1 y scTrk2 está en la longitud del lazo que se sitúa entre el primer y el segundo dominio transmembrana, que es mayor en el caso de scTrk1 [32]. El lazo de longitudes similares en *Aspergillus* se sitúa entre el segundo y el tercer dominio transmembrana predichos. En el caso del hongo la longitud de este lazo es similar en TrkA y TrkB (301 aa y 294 aa respectivamente), mientras que es ligeramente menor en el caso de TrkC (150 aa), lo que no es suficiente para compararlos con las estructuras predichas en *S. cerevisiae*. A la vista de estos resultados no podemos proponer a los posibles homólogos de ScTrk1 y ScTrk2 basándonos en sus secuencias. Futuros estudios funcionales de cada uno de los diferentes transportadores de *A. nidulans* podrán darnos esa información. Podría ocurrir algo parecido a lo que se ha visto en *S. pombe* que al contrario de lo visto en otras levaduras ambos transportadores contribuyen por igual en el transporte de potasio [93]. El análisis transcripcional de los genes *trk* en *A. nidulans* muestra distintos patrones de regulación para estos tres genes. El potasio inhibe la expresión de TrkA, esto sugiere que TrkA es el responsable del transporte de alta afinidad, pero la delección de *trkA* no modifica el crecimiento en bajas concentraciones de potasio y la sobreexpresión de este canal mejora muy poco el crecimiento con respecto a la cepa silvestre. *trkC* y *trkB* no están regulados por potasio, pero solo TrkB juega un papel importante en la resistencia a la toxicidad catiónica. En la levadura se propone la formación de un complejo heteromérico entre diferentes proteínas Trk [32] y en *A. nidulans* podría estar ocurriendo algo parecido formando complejos di/triméricos con los diferentes Trk. En este modelo TrkB es el núcleo del transporte y distintas combinaciones TrkA/B/C serían [148]

responsables del transporte de alta o baja afinidad de potasio. HalA tiene un doble papel en la regulación de los transportadores Trk. En primer lugar HalA regula de forma negativa la expresión de TrkA por un exceso de potasio y esta es una regulación transcripcional. Este mecanismo regulador no está descrito anteriormente puesto que no se ha descrito una modificación de la regulación transcripcional de los transportadores *TRK1* y *TRK2* en fondos genéticos mutantes *hal4/hal5* en *S. cerevisiae* [32,77].

Para comprender el papel “transcripcional de HalA” sobre TrkA, en el futuro se deberá determinar si existe una regulación directa sobre un factor de transcripción que mediese la regulación de la homeostasis de cationes o si se da una regulación indirecta a través de la concentración intracelular de potasio afectando así a otras rutas de señalización que medien la respuesta a este y otros cationes. La preferente localización citoplasmática de HalA en concentraciones extracelulares elevadas de potasio nos puede sugerir la existencia de un mecanismo regulatorio, muy probablemente una fosforilación, actuando sobre un factor de transcripción. Esta fosforilación podría estar activando o inhibiendo el factor de transcripción y este a su vez puede tratarse de un supresor o un activador, por lo que existen varias posibilidades de regulación a este nivel. Nuestros estudios descartan que SltA sea ese factor de transcripción y por lo tanto se abren nuevas líneas de investigación para su búsqueda. Existe un candidato para este papel, el factor de transcripción MsnA, que está regulado por elevadas concentraciones de sal [143] y que será objeto de futuros estudios. También los factores transcripcionales PbsA y PtpA son posibles candidatos dado que participan en rutas de estrés salino y son regulados en presencia de elevadas concentraciones de sales, sugiriendo un mecanismo de retroalimentación específico para sales [143]. Podría pensarse que esta regulación se diera en determinados momentos del ciclo celular, como por ejemplo durante la conidiación. Vemos la existencia de un sistema de regulación de

DISCUSIÓN

la expresión de un transportador Trk por la concentración de potasio, algo que no se había visto hasta este momento.

Por otro lado HalA está implicada en la localización del transportador de potasio TrkB. Cuando en el medio extracelular existe una baja concentración de potasio, la proteína HalA se distribuye próxima a la membrana plasmática. Trabajos recientes como el mostrado por [92] han demostrado que la presencia de ScHal4 es necesaria para la estabilización del transportador en la membrana plasmática en condiciones de baja concentración de potasio extracelular.

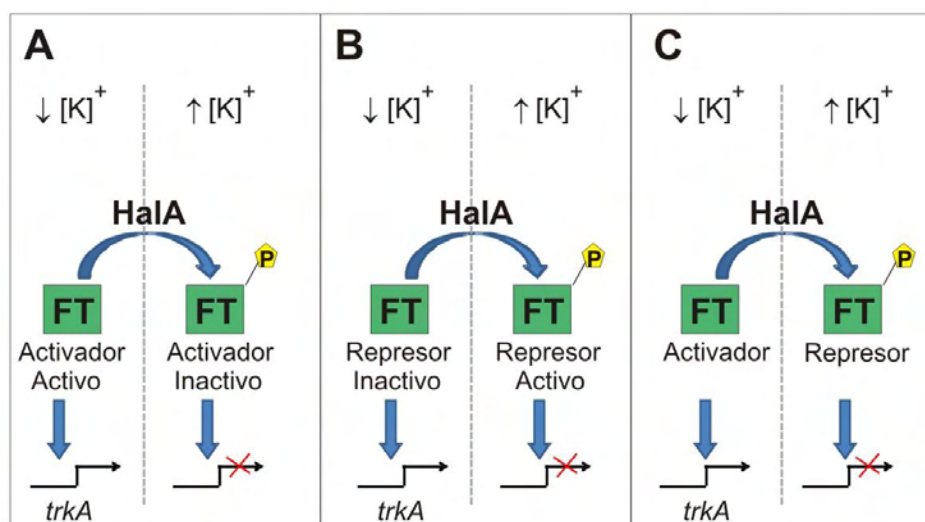


Figura D2: Posible mecanismo de regulación del factor de transcripción implicado en la ruta de homeostasis catiónica.

Las proteínas ScHal4p ScHal5p son efectores positivos necesarios para el funcionamiento de Trk1 y Trk2, ya que mutantes *hal4 hal5* no son capaces de crecer en medios con bajas concentraciones de potasio, posiblemente debido a una mala toma de potasio [77]. En este trabajo demostramos el efecto de la proteína HalA en la localización de uno de los transportadores de potasio. La localización de TrkB en

presencia de una proteína HalA funcional difiere ligeramente en medio con elevada concentración de potasio, donde se localiza en la membrana plasmática y en mayor medida en otros grandes agregados, y en medio con baja concentración de potasio, donde su localización es mayoritaria en la membrana plasmática.

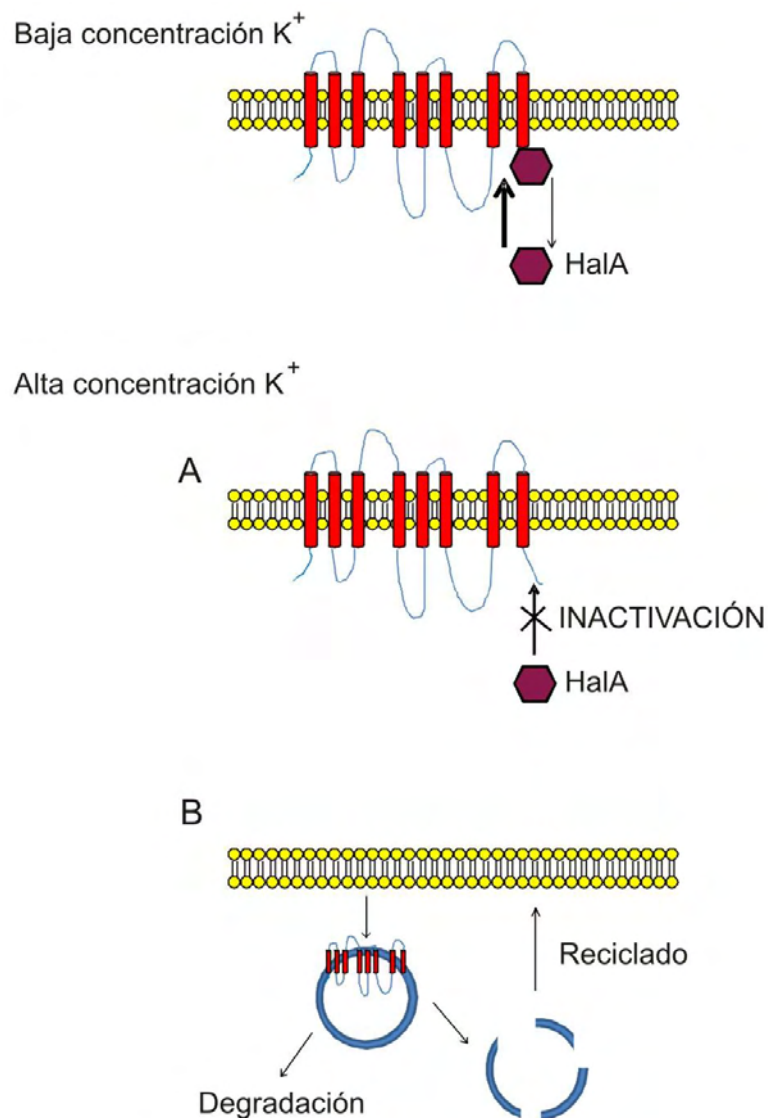


Figura D3: Esquema de los posibles mecanismos propuestos para la actuación de la proteína HalA en presencia de altas o de bajas concentraciones de potasio.

La ausencia de HalA modifica este patrón de distribución en sentido contrario a lo esperado o a lo que se observa en *S. cerevisiae* [92], cuando aumenta la concentración de potasio en el medio extracelular también aumenta la cantidad de proteína HalA que se localiza en la membrana plasmática y por el contrario cuando el medio extracelular presenta una menor concentración de potasio, la proteína tiende a localizarse en la fracción que contiene grandes agregados proteicos no solubles, generalmente asociados con la membrana plasmática

La distinta distribución de TrkB en cepas que carecen de una proteína HalA funcional puede explicar los fenotipos de toxicidad a elevadas concentraciones de potasio y el requerimiento de este catión cuando su concentración es baja en el medio.

Según parecen indicar los resultados de los experimentos de fraccionamiento, cuando el transportador es requerido en la membrana para llevar a cabo su función, es decir, en condiciones en las que la concentración de potasio extracelular es baja, este transportador no se localiza principalmente en la membrana, sino en otros complejos o grandes agregados. Por el contrario, cuando la concentración extracelular es elevada y no es necesario transportar más potasio al interior celular, los transportadores TrkB se localizan en la membrana plasmática de la célula.

La diferente localización de los transportadores de potasio en la membrana o en grandes agregados en función de la concentración extracelular de potasio podría estar indicándonos un posible papel de la ruta endocítica en la retirada de transportadores de la membrana en endosomas cuando estos transportadores no son requeridos, por ejemplo en el caso de un exceso de potasio en el medio extracelular. La localización de los transportadores varía en función de si existe un HalA funcional o no, lo que podría estar indicándonos que HalA bien directamente o bien a través de una ruta más

compleja estaría mediando la señalización para la internalización de TrkB mediante el sistema clásico de endocitosis.

Esta hipótesis de la diferente localización subcelular de los transportadores de potasio, no excluye que el transportador TrkB pueda ser activado en ausencia de la proteína HalA, por ejemplo, por otra proteína del tipo Hal, codificada por el gen AN2943. En *S. cerevisiae* se conoce como Trk1 es fosforilado por Hal4p/Hal5p [77,131]. En *S. pombe* existe la evidencia de una fosforilación de Trk1 pero, de acuerdo a nuestros resultados, la fosforilación de Trk1 como respuesta a las bajas concentraciones de potasio extracelular no es dependiente de Hal4 [93]. En este trabajo no hemos sido capaces de detectar formas modificadas o fosforiladas de HalA o de TrkB como respuesta a altas o bajas concentraciones externas de sodio o potasio. Tampoco nos fue posible detectar modificaciones postransduccionales en las diferentes fracciones subcelulares, sugiriendo la existencia de o bien modificaciones transitorias o bien un mecanismo regulatorio alternativo. Hay que tener en cuenta que las condiciones en las que aislamos y estudiamos las proteínas de *Aspergillus* ya se han usado para ver fosforilaciones y han funcionado [144,145].

Este trabajo presenta evidencias de una divergencia en la homeostasis de cationes entre hongos filamentosos y levaduras. Los componentes de transporte y regulatorios están presentes en ambos grupos, pero su número y su función varían entre ellos. El trabajo que se nos plantea en el futuro es el de analizar los mecanismos regulatorios responsables de la halotolerancia en *A. nidulans* ya que estos pueden proveer otros mecanismos alternativos o específicos en otros hongos relacionados ya que la homeostasis catiónica tiene un gran interés comercial y clínico.

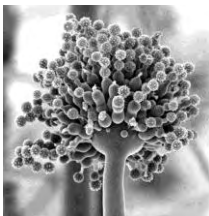
CONCLUSIONES



6.- CONCLUSIONES

- 1.- La búsqueda de supresores en un mutante deficiente en la respuesta a pH ambiental ha permitido la identificación y caracterización de HalA como una proteína quinasa implicada en la regulación de la homeostasis de cationes monovalentes en *A. nidulans*. Sin embargo, HalA no pertenece a la ruta de señalización del pH extracelular.
- 2.- Al contrario del papel descrito para las quinasas de la familia Hal en otros organismos, HalA no participa directamente en la homeostasis de cationes bivalentes ni en la ruta de asimilación de nitrógeno.
- 3.- La proteína quinasa regula, al menos, a dos niveles la homeostasis de cationes monovalentes: por un lado modulando la expresión del gen que codifica para el canal de potasio TrkA y por otro determinando la localización subcelular del canal TrkB.
- 4.- La localización en la célula de HalA está regulada por potasio y puede ser un elemento clave en su función quinasa, posiblemente modificando efectores en la proximidad de la membrana plasmática y en el citoplasma.
- 5.- Tomando como ejemplos a *S. cerevisiae* y *A. nidulans*, se evidencia una notable divergencia entre la regulación de la homeostasis de cationes entre hongos levaduriformes y filamentosos. El papel de HalA en combinación con el factor de transcripción SltA específico de hongos filamentosos indica la compleja regulación cruzada entre cationes monovalentes y divalentes existente en *A. nidulans*, donde los resultados obtenidos sugieren que la actividad de HalA sobre los transportadores Trk puede no ser directa.

BIBLIOGRAFÍA



6.- BIBLIOGRAFÍA

1. Pontecorvo, G., J. A. Roper, L. M. Hemmons, K. D. Macdonald et al (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. **5** :141-238.
2. Adams, T. H., J. K. Wieser, y J. H. Yu (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62** (1) :35-54.
3. Timberlake, W. E. (1990) Molecular genetics of *Aspergillus* development. Annu. Rev. Genet. **24** :5-36.
4. Yu, J. H., J. H. Mah, y J. A. Seo (2006) Growth and developmental control in the model and pathogenic aspergilli. Eukaryot. Cell **5** (10) :1577-1584.
5. Upshall, A., T. Gilbert, G. Saari, P. J. O'Hara et al (1986) Molecular analysis of the argB gene of *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. **204** (2) :349-354.
6. Rossi, A. y H. N. Arst, Jr. (1990) Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than wild type when grown at more moderate pH. FEMS Microbiol. Lett. **54** (1-3) :51-53.
7. Galagan, J. E., S. E. Calvo, C. Cuomo, L. J. Ma et al (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. Nature **438** (7071) :1105-1115.
8. Peñalva, M. A. (2001) A fungal perspective on human inborn errors of metabolism: alkaptonuria and beyond. Fungal. Genet. Biol. **34** (1) :1-10.
9. Nayak, T., E. Szewczyk, C. E. Oakley, A. Osmani et al (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. Genetics **172** (3) :1557-1566.
10. De Souza, C. P., A. H. Osmani, S. B. Hashmi, y S. A. Osmani (2004) Partial nuclear pore complex disassembly during closed mitosis in *Aspergillus nidulans*. Curr. Biol. **14** (22) :1973-1984.
11. Garzia, A., O. Etxebeste, E. Herrero-Garcia, U. Ugalde et al (2010) The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces brlA expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. Mol. Microbiol. **75** (5) :1314-1324.
12. Liu, H. L., A. H. Osmani, L. Ukil, S. Son et al (2010) Single-step affinity purification for fungal proteomics. Eukaryot. Cell **9** (5) :831-833.
13. Yang, L., L. Ukil, A. Osmani, F. Nahm et al (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot. Cell **3** (5) :1359-1362.

14. **Serrano, R., J. M. Mulet, G. Rios, J. A. Marquez et al** (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress in plants. *J. Exp. Botany* **50** :1023-1036.
15. **Serrano, R.** (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. Cytol.* **165** :1-52.
16. **Lifton, R. P.** (1996) Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* **272** (5262) :676-680.
17. **Calero, F., N. Gomez, J. Arino, y J. Ramos** (2000) Trk1 and Trk2 define the major K(+) transport system in fission yeast. *J. Bacteriol.* **182** (2) :394-399.
18. **Ko, C. H. y R. F. Gaber** (1991) TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **11** (8) :4266-4273.
19. **Michel, B., C. Lozano, M. Rodriguez, R. Coria et al** (2006) The yeast potassium transporter TRK2 is able to substitute for TRK1 in its biological function under low K⁺ and low pH conditions. *Yeast* **23** (8) :581-589.
20. **Ruiz, A., R. M. del Carmen, M. A. Sanchez-Garrido, J. Arino et al** (2004) The Ppz protein phosphatases regulate Trk-independent potassium influx in yeast. *FEBS Lett.* **578** (1-2) :58-62.
21. **Bertl, A., J. Ramos, J. Ludwig, H. Lichtenberg-Frate et al** (2003) Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of trk1, trk2 and tok1 null mutations. *Mol. Microbiol.* **47** (3) :767-780.
22. **Bañuelos, M. A., R. Madrid, y A. Rodriguez-Navarro** (2000) Individual functions of the HAK and TRK potassium transporters of *Schwanniomyces occidentalis*. *Mol. Microbiol.* **37** (3) :671-679.
23. **Maresova, L., E. Urbankova, D. Gaskova, y H. Sychrova** (2006) Measurements of plasma membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells reveal the importance of the Tok1 channel in membrane potential maintenance. *FEMS Yeast Res.* **6** (7) :1039-1046.
24. **Kinclova-Zimmermannova, O., D. Gaskova, y H. Sychrova** (2006) The Na⁺,K⁺/H⁺ -antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **6** (5) :792-800.
25. **Fairman, C., X. Zhou, y C. Kung** (1999) Potassium uptake through the TOK1 K⁺ channel in the budding yeast. *J. Membr. Biol.* **168** (2) :149-157.
26. **Costenoble, R., L. Adler, C. Niklasson, y G. Liden** (2003) Engineering of the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic production of mannitol. *FEMS Yeast Res.* **3** (1) :17-25.

27. **Ramos, J., R. Alijo, R. Haro, y A. Rodriguez-Navarro** (1994) TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **176** (1) :249-252.
28. **Ruiz, A. y J. Arino** (2007) Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA sodium ATPase system. *Eukaryot. Cell* **6** (12) :2175-2183.
29. **Garciadeblas, B., M. E. Senn, M. A. Banuelos, y A. Rodriguez-Navarro** (2003) Sodium transport and HKT transporters: the rice model. *Plant J.* **34** (6) :788-801.
30. **Mendizabal, I., A. Pascual-Ahuir, R. Serrano, y I. F. de Larrinoa** (2001) Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast ENA1 gene. *Mol. Genet. Genomics* **265** (5) :801-811.
31. **Haro, R., B. Garcíadeblas, y A. Rodríguez-Navarro** (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* **291** (2) :189-191.
32. **Ariño, J., J. Ramos, y H. Sychrova** (2010) Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74** (1) :95-120.
33. **Nowikovsky, K., S. Reipert, R. J. Devenish, y R. J. Schweyen** (2007) Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K^+/H^+ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death. Differ.* **14** (9) :1647-1656.
34. **Maresova, L. y H. Sychrova** (2005) Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* kha1 deletion mutants. *Mol. Microbiol.* **55** (2) :588-600.
35. **Brett, C. L., D. N. Tukaye, S. Mukherjee, y R. Rao** (2005) The yeast endosomal Na^+K^+/H^+ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol. Biol. Cell* **16** (3) :1396-1405.
36. **Cagnac, O., M. Leterrier, M. Yeager, y E. Blumwald** (2007) Identification and characterization of Vnx1p, a novel type of vacuolar monovalent cation/ H^+ antiporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **282** (33) :24284-24293.
37. **Caddick, M. X., A. G. Brownlee, y H. N. Arst, Jr.** (1986) Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **203** (2) :346-353.
38. **Caddick, M. X., A. G. Brownlee, y H. N. Arst, Jr.** (1986) Phosphatase regulation in *Aspergillus nidulans*: responses to nutritional starvation. *Genet. Res.* **47** (2) :93-102.

39. **Espeso, E. A., J. Tilburn, H. N. Arst, Jr., y M. A. Peñalva** (1993) pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12** (10) :3947-3956.
40. **Espeso, E. A. y M. A. Peñalva** (1996) Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J. Biol. Chem.* **271** (46) :28825-28830.
41. **Dorn, G.** (1965) Phosphatase mutants in *Aspergillus nidulans*. *Science* **150** (700) :1183-1184.
42. **Peñalva, M. A., J. Tilburn, E. Bignell, y H. N. Arst, Jr.** (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol.* **16** (6) :291-300.
43. **Tilburn, J., S. Sarkar, D. A. Widdick, E. A. Espeso et al** (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14** (4) :779-790.
44. **Klug, A. y D. Rhodes** (1987) Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52** :473-482.
45. **Diez, E., J. Alvaro, E. A. Espeso, L. Rainbow et al** (2002) Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J.* **21** (6) :1350-1359.
46. **Orejas, M., E. A. Espeso, J. Tilburn, S. Sarkar et al** (1995) Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* **9** (13) :1622-1632.
47. **Espeso, E. A. y H. N. Arst, Jr.** (2000) On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Mol. Cell Biol.* **20** (10) :3355-3363.
48. **Mingot, J. M., J. Tilburn, E. Diez, E. Bignell et al** (1999) Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol. Cell Biol.* **19** (2) :1390-1400.
49. **Mingot, J. M., E. A. Espeso, E. Diez, y M. A. Peñalva** (2001) Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol. Cell Biol.* **21** (5) :1688-1699.
50. **Findon, H., A. M. Calcagno-Pizarelli, J. L. Martinez, A. Spielvogel et al** (2010) Analysis of a novel calcium auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *Fungal. Genet. Biol.* **47** (7) :647-655.

51. **Biggin, P. C., T. Roosild, y S. Choe** (2000) Potassium channel structure: domain by domain. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10** (4) :456-461.
52. **Lundback, A. K., S. A. Muller, A. Engel, y H. Hebert** (2009) Assembly of Kch, a putative potassium channel from *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.* **168** (2) :288-293.
53. **Miller, C.** (2000) An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* **1** (4) :REVIEWS0004-
54. **Jenkinson, D. H.** (2006) Potassium channels--multiplicity and challenges. *Br. J. Pharmacol.* **147 Suppl 1** :S63-S71.
55. **Brent, L. H., J. L. Butler, W. T. Woods, Jr., y J. K. Bubien** (1990) Transmembrane ion conductance in human B lymphocyte activation. *J. Immunol.* **145** (8) :2381-2389.
56. **MacKinnon, R.** (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* **555** (1) :62-65.
57. **Gutman, G. A., K. G. Chandy, J. P. Adelman, J. Aiyar et al** (2003) International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **55** (4) :583-586.
58. **Doyle, D. A., C. J. Morais, R. A. Pfuetzner, A. Kuo et al** (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280** (5360) :69-77.
59. **Kreusch, A., P. J. Pfaffinger, C. F. Stevens, y S. Choe** (1998) Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* **392** (6679) :945-948.
60. **Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene et al** (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* **417** (6888) :515-522.
61. **Kuo, A., J. M. Gulbis, J. F. Antcliff, T. Rahman et al** (2003) Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* **300** (5627) :1922-1926.
62. **Sansom, M. S.** (1998) Ion channels: a first view of K⁺ channels in atomic glory. *Curr. Biol.* **8** (13) :R450-R452.
63. **Gaber, R. F., C. A. Styles, y G. R. Fink** (1988) TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **8** (7) :2848-2859.
64. **Madrid, R., M. J. Gomez, J. Ramos, y A. Rodriguez-Navarro** (1998) Ectopic potassium uptake in trk1 trk2 mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* **273** (24) :14838-14844.

65. **Lauwers, E. y B. Andre** (2006) Association of yeast transporters with detergent-resistant membranes correlates with their cell-surface location. *Traffic*. **7** (8) :1045-1059.
66. **Bagnat, M., S. Keranen, A. Shevchenko, A. Shevchenko et al** (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97** (7) :3254-3259.
67. **Gaigg, B., B. Timischl, L. Corbino, y R. Schneiter** (2005) Synthesis of sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase to the cell surface of yeast. *J. Biol. Chem.* **280** (23) :22515-22522.
68. **Soldatenkov, V. A., J. A. Velasco, M. A. Avila, A. Dritschilo et al** (1995) Isolation and characterization of SpTRK, a gene from *Schizosaccharomyces pombe* predicted to encode a K⁺ transporter protein. *Gene* **161** (1) :97-101.
69. **Haro, R., L. Sainz, F. Rubio, y A. Rodriguez-Navarro** (1999) Cloning of two genes encoding potassium transporters in *Neurospora crassa* and expression of the corresponding cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **31** (2) :511-520.
70. **Prista, C., J. C. Gonzalez-Hernandez, J. Ramos, y M. C. Loureiro-Dias** (2007) Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* **153** (Pt 9) :3034-3043.
71. **Nakamura, T., N. Yamamuro, S. Stumpe, T. Unemoto et al** (1998) Cloning of the trkAH gene cluster and characterization of the Trk K(+)-uptake system of *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology* **144** (Pt 8) :2281-2289.
72. **Bertl, A., C. L. Slayman, y D. Gradmann** (1993) Gating and conductance in an outward-rectifying K⁺ channel from the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membr. Biol.* **132** (3) :183-199.
73. **Ketchum, K. A., W. J. Joiner, A. J. Sellers, L. K. Kaczmarek et al** (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* **376** (6542) :690-695.
74. **Bertl, A., H. Bihler, J. D. Reid, C. Kettner et al** (1998) Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, DUK1 (TOK1), in situ. *J. Membr. Biol.* **162** (1) :67-80.
75. **Proft, M. y K. Struhl** (2004) MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118** (3) :351-361.
76. **Mendoza, I., F. Rubio, A. Rodriguez-Navarro, y J. M. Pardo** (1994) The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269** (12) :8792-8796.

77. **Mulet, J. M., M. P. Leube, S. J. Kron, G. Rios et al** (1999) A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol. Cell Biol.* **19** (5) :3328-3337.
78. **Yenush, L., J. M. Mulet, J. Arino, y R. Serrano** (2002) The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.* **21** (5) :920-929.
79. **Nadal E., J. Clotet, F. Posas, R. Serrano et al** (1998) The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95** (13) :7357-7362.
80. **Forment, J., J. M. Mulet, O. Vicente, y R. Serrano** (2002) The yeast SR protein kinase Sky1p modulates salt tolerance, membrane potential and the Trk1,2 potassium transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1565** (1) :36-40.
81. **Rios, G., A. Ferrando, y R. Serrano** (1997) Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the HAL1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13** (6) :515-528.
82. **Munson, A. M., D. H. Haydon, S. L. Love, G. L. Fell et al** (2004) Yeast ARL1 encodes a regulator of K⁺ influx. *J. Cell Sci.* **117** (Pt 11) :2309-2320.
83. **O'Rourke, S. M. y I. Herskowitz** (2004) Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol. Biol. Cell* **15** (2) :532-542.
84. **Ciechanover, A.** (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* **17** (24) :7151-7160.
85. **Hicke, L. y H. Riezman** (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* **84** (2) :277-287.
86. **Galan, J. M., V. Moreau, B. Andre, C. Volland et al** (1996) Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.* **271** (18) :10946-10952.
87. **Fuglsang, A. T., S. Visconti, K. Drumm, T. Jahn et al** (1999) Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H(+)-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr(946)-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr(947). *J. Biol. Chem.* **274** (51) :36774-36780.
88. **Antz, C., T. Bauer, H. Kalbacher, R. Frank et al** (1999) Control of K⁺ channel gating by protein phosphorylation: structural switches of the inactivation gate. *Nat. Struct. Biol.* **6** (2) :146-150.

89. **Wang, S., M. J. Morales, S. Liu, H. C. Strauss et al** (1996) Time, voltage and ionic concentration dependence of rectification of h-erg expressed in *Xenopus oocytes*. *FEBS Lett.* **389** (2) :167-173.
90. **Liu, K. H. y Y. F. Tsay** (2003) Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J.* **22** (5) :1005-1013.
91. **Merchan, S., D. Bernal, R. Serrano, y L. Yenush** (2004) Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryot. Cell* **3** (1) :100-107.
92. **Pérez-Valle, J., H. Jenkins, S. Merchan, V. Montiel et al** (2007) Key role for intracellular K⁺ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters. *Mol. Cell Biol.* **27** (16) :5725-5736.
93. **Thornton, G., C. R. Wilkinson, W. M. Toone, y N. Jones** (2005) A novel pathway determining multidrug sensitivity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* **10** (10) :941-951.
94. **Spielvogel, A., H. Findon, H. N. Arst, L. Araújo-Bazán et al** (2008) Two zinc finger transcription factors, CrzA and SltA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.* **414** (3) :419-429.
95. **Fernandez-Martínez, J.** (2006) Mecanismos y señales que regulan el transporte nuclear del factor de transcripción PacC en *Aspergillus nidulans*. **Tesis Doctoral**
96. **Fernández-Martínez, J., C. V. Brown, E. Diez, J. Tilburn et al** (2003) Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J. Mol. Biol.* **334** (4) :667-684.
97. **Brown, CV.** (1999) Mutational analysis of PacC, the pH regulatory transcription factor in *Aspergillus nidulans*.
98. **Espeso, E. A., J. Tilburn, L. Sanchez-Pulido, C. V. Brown et al** (1997) Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J. Mol. Biol.* **274** (4) :466-480.
99. **Peñalva, M. A.** (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal. Genet. Biol.* **42** (12) :963-975.
100. **Mooney, J. L. y L. N. Yager** (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* **4** (9) :1473-1482.
101. **Clutterbuck, A. J.** (1973) Gene symbols in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.* **21** (3) :291-296.

102. **Tilburn, J., C. Scazzocchio, G. G. Taylor, J. H. Zabicky-Zissman et al** (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26** (2-3) :205-221.
103. **Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** :248-254.
104. **Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259) :680-685.
105. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers et al** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215** (3) :403-410.
106. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin et al** (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25** (24) :4876-4882.
107. **Espeso, E. A., L. Cobeño, y H. N. Arst, Jr.** (2005) Discrepancies between recombination frequencies and physical distances in *Aspergillus nidulans*: implications for gene identification. *Genetics* **171** (2) :835-838.
108. **Clutterbuck, A. J.** (1974) *Aspergillus nidulans*. Handbook of Genetics, Vol. 1: Bacteria, Bacteriophage and Fungi, edited by R. C. King. Plenum Press, New York. 447-510.
109. **Hynes, J. B., Y. C. Yang, J. E. McGill, S. J. Harmon et al** (1984) Improved synthesis and antitumor evaluation of 5,8-dideazaisofolic acid and closely related analogues. *J. Med. Chem.* **27** (2) :232-235.
110. **Joseph, J. D. y A. R. Means** (2000) Identification and characterization of two Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinases required for normal nuclear division in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **275** (49) :38230-38238.
111. **Dobzhansky, T.** (1930) Translocations Involving the Third and the Fourth Chromosomes of *Drosophila Melanogaster*. *Genetics* **15** (4) :347-399.
112. **Gems, D. H. y A. J. Clutterbuck** (1993) Co-transformation with autonomously-replicating helper plasmids facilitates gene cloning from an *Aspergillus nidulans* gene library. *Curr. Genet.* **24** (6) :520-524.
113. **Asaga, H. y A. Ishigami** (2007) Microglial expression of peptidylarginine deiminase 2 in the prenatal rat brain. *Cell Mol. Biol. Lett.* **12** (4) :536-544.
114. **Gachet, Y., C. Reyes, T. Courtheoux, S. Goldstone et al** (2008) Sister kinetochore recapture in fission yeast occurs by two distinct mechanisms, both requiring Dam1 and Klp2. *Mol. Biol. Cell* **19** (4) :1646-1662.

115. **Hanks, S. K. y T. Hunter** (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9** (8) :576-596.
116. **Goossens, A., F. N. de La, J. Forment, R. Serrano et al** (2000) Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol. Cell Biol.* **20** (20) :7654-7661.
117. **Buxton, F. P. y A. Radford** (1983) Cloning of the structural gene for orotidine 5'-phosphate carboxylase of *Neurospora crassa* by expression in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **190** (3) :403-405.
118. **De Craene, J. O., O. Soetens, y B. Andre** (2001) The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. *J. Biol. Chem.* **276** (47) :43939-43948.
119. **Ariño, J.** (2002) Novel protein phosphatases in yeast. *Eur. J. Biochem.* **269** (4) :1072-1077.
120. **Clotet, J., E. Gari, M. Aldea, y J. Arino** (1999) The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol. Cell Biol.* **19** (3) :2408-2415.
121. **Bernreiter, A., A. Ramon, J. Fernandez-Martinez, H. Berger et al** (2007) Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* **27** (3) :791-802.
122. **Pantazopoulou, A. y M. A. Penalva** (2009) Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol. Biol. Cell* **20** (20) :4335-4347.
123. **Sukharev, S. y D. P. Corey** (2004) Mechanosensitive channels: multiplicity of families and gating paradigms. *Sci. STKE.* **2004** (219) :re4-
124. **Alcazar-Fuoli, L., E. Mellado, Garcia-Effron G, Lopez JF et al** (2007) Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids* **73** :339-347.
125. **Araújo-Bazán, L., M. A. Peñalva, y E. A. Espeso** (2008) Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **67** (4) :891-905.
126. **Taheri-Talesh, N., T. Horio, L. Araújo-Bazán, X. Dou et al** (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **19** (4) :1439-1449.
127. **Calero, F. y J. Ramos** (2003) K⁺ fluxes in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res.* **4** (1) :1-6.

128. **Prista, C., M. C. Loureiro-Dias, V. Montiel, R. Garcia et al** (2005) Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* **5** (8) :693-701.
129. **Caddick, M. X., D. Peters, y A. Platt** (1994) Nitrogen regulation in fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65** (3) :169-177.
130. **Krappmann, S. y G. H. Braus** (2005) Nitrogen metabolism of *Aspergillus* and its role in pathogenicity. *Med. Mycol.* **43 Suppl 1** :S31-S40.
131. **Yenush, L., S. Merchan, J. Holmes, y R. Serrano** (2005) pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol. Cell Biol.* **25** (19) :8683-8692.
132. **Serrano, R., A. Ruiz, D. Bernal, J. R. Chambers et al** (2002) The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol. Microbiol.* **46** (5) :1319-1333.
133. **Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly et al** (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418** (6896) :387-391.
134. **O'Neil, J. D., M. Bugno, Stanley M.S., Barham-Morris J.B et al** (2002) Cloning of a novel gene encoding a C2H2 zinc finger protein that alleviates sensitivity to abiotic stresses in *Aspergillus nidulans*. *Micology research* **106** :491-498.
135. **Harris, S. D., G. Turner, V. Meyer, E. A. Espeso et al** (2009) Morphology and development in *Aspergillus nidulans*: a complex puzzle. *Fungal. Genet. Biol.* **46 Suppl 1** :S82-S92.
136. **Moorhead, G. B., L. Trinkle-Mulcahy, y A. Ulke-Lemee** (2007) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** (3) :234-244.
137. **Son, S. y S. A. Osmani** (2009) Analysis of all protein phosphatase genes in *Aspergillus nidulans* identifies a new mitotic regulator, fcp1. *Eukaryot. Cell* **8** (4) :573-585.
138. **Posas, F., M. Bollen, W. Stalmans, y J. Arino** (1995) Biochemical characterization of recombinant yeast PPZ1, a protein phosphatase involved in salt tolerance. *FEBS Lett.* **368** (1) :39-44.
139. **Ferrando, A., S. J. Kron, G. Rios, G. R. Fink et al** (1995) Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene HAL3. *Mol. Cell Biol.* **15** (10) :5470-5481.
140. **Doonan, J. H. y N. R. Morris** (1989) The bimG gene of *Aspergillus nidulans*, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatase 1. *Cell* **57** (6) :987-996.

141. **O'Connell, M.** (1992) An extra copy of *nimE^{cyclinB}* elevates pre-MPF levels and partially suppresses mutation of *nimT^{cdc25}* in *Aspergillus nidulans*. EMBO J. **11** :2139-2149.
142. **Casado, C., L. Yenush, C. Melero, M. C. Ruiz et al** (2010) Regulation of Trk-dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase. FEBS Lett. **584** (11) :2415-2420.
143. **Han, K. H. y R. A. Prade** (2002) Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. Mol. Microbiol. **43** (5) :1065-1078.
144. **Herranz, S., J. M. Rodriguez, H. J. Bussink, J. C. Sanchez-Ferrero et al** (2005) Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **102** (34) :12141-12146.
145. **Hervás-Aguilar, A., J. M. Rodriguez, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr. et al** (2007) Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. J. Biol. Chem. **282** (48) :34735-34747.